

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION IMMUNOLOGIQUE ET MOLÉCULAIRE DE
SYSTÈMES AUTOIMMUNS ASSOCIÉS À LA POLYARTHRITE
RHUMATOÏDE**

PAR

NORMAND DESPRÉS

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE

ET

SERVICE DE RHUMATOLOGIE

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DE MÉDECINE

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.) EN BIOLOGIE CELLULAIRE

AOÛT 1995



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-612-09456-1

Canada

*À mon épouse, pour l'amour
et le support qu'elle m'a donné
tout au long de mon travail*

*À ma mère et en mémoire de
mon père pour la confiance et
la détermination qu'ils m'ont transmis.*

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
Table des matières	I
Liste des illustrations	V
Liste des abréviations, sigles et symboles	IX
Résumé	XII
1.0 <u>INTRODUCTION</u>	1
1.1 Autotolérance immunitaire	3
1.1.1 Sélection négative des cellules T	4
1.1.2 Sélection négative des cellules B	6
1.2 Autoimmunité	8
1.2.1 Mécanismes associés à la rupture de l'autotolérance	8
1.2.2 Maladies autoimmunes	10
1.2.3 Maladies autoimmunes spécifiques d'organe	11
1.2.4 Maladies autoimmunes systémiques	13
1.3 La polyarthrite rhumatoïde	16
1.3.1 Susceptibilité génétique associée au MHC II	19
1.3.2 Facteurs étiologiques proposés	21
1.3.3 Mécanismes de destruction de l'articulation	23
1.3.4 Cytokines	25
1.3.5 Autoimmunité médiée via les cellules T	26
1.3.6 Autoimmunité médiée via les cellules B et autoanticorps	28
1.4 Hypothèse de travail	33

2.0	<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	37
2.1	Sérums et anticorps utilisés	38
2.2	Système Sa/anti-Sa	38
2.2.1	Patients et témoins utilisés pour la signification clinique des autoanticorps anti-Sa	38
2.2.2	Détection des autoanticorps anti-Sa dans le liquide synovial	39
2.2.3	Sérums et anticorps de référence utilisés dans la caractérisation du système Sa/anti-Sa	39
2.3	Autoanticorps anti-calpastatine	41
2.3.1	Sérums et anticorps utilisés pour le clonage et la caractérisation du système calpastatine/anti-calpastatine	41
2.4	Sérologie autoimmune	41
2.5	Préparation des sources antigéniques	42
2.5.1	Extraits de tissus humains	42
2.5.2	Composantes articulaires	43
2.5.3	Cellules et lignées cellulaires	43
2.5.4	Filaments intermédiaires (FI)	44
2.5.5	Antigènes associés au virus Epstein-Barr (EBV)	45
2.5.6	Protéines de stress (HSPs)	46
2.6	Purification par chromatographie d'échange d'ions	46
2.7	Technique immunoenzymatique (ELISA)	47
2.8	Clonage de la protéine disulfide isomérase (PDI) par la réaction en chaîne de polymérase (PCR)	49
2.9	Criblage d'une bibliothèque d'ADNc avec des sérums de patients	49
2.10	Séquençage de l'ADN	52

2.11 Expression et purification de protéines de fusion et recombinante	53
2.12 Absorptions de sérums	55
2.13 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	56
2.13.1 Coloration des protéines dans les gels de polyacrylamide	57
2.14 Immunobuvardage	57
2.14.1 Immunodétection par méthode colorimétrique	58
2.14.2 Immunodétection par chemiluminescence	59
2.15 Analyse d'image	59
2.16 Microséquençage des protéines	60
2.17 Purification des anticorps par affinité	61
2.18 Traitements enzymatiques	61
2.19 Immunofluorescence	62
3.0 <u>RÉSULTATS</u>	64
3.1 Identification de l'autoantigène Sa par immunobuvardage en utilisant des sérums de patients atteints de PR	65
3.2 Détection de l'antigène Sa dans le placenta humain	67
3.3 Identification du Sa dans la membrane synoviale rhumatoïde	68
3.4 L'antigène Sa isolé de la rate, du placenta et de la synoviale rhumatoïde possède des déterminants antigéniques communs	68
3.5 Détection des autoanticorps anti-Sa dans les liquides synoviaux rhumatoïdes	69
3.6 Caractérisation du système autoimmun Sa/anti-Sa	70
3.7 Le système Sa est distinct des autres marqueurs autoimmuns liés à la PR	71

3.8	Caractérisation de l'autoantigène Sa	74
3.9	Purification de l'antigène Sa placentaire	76
3.10	Microséquençage des bandes polypeptidiques associées à l'antigène Sa	77
3.11	Analyse de la réactivité des anticorps anti-Sa avec la vimentine	78
3.12	Isolement de l'ADNc codant pour la PDI	79
3.13	Expression de l'ADNc codant pour la PDI, purification des protéines de fusion et recombinante et détection des anticorps anti-PDI dans les sérums de patients	80
3.14	Sensibilité et spécificité des autoanticorps anti-Sa dans la PR	81
3.15	Isolement du clone d'ADNc par immunocriblage de la bibliothèque d'expression avec des sérums de patients rhumatoïdes	83
3.16	Séquençage de l'ADNc codant pour le clone RA-1	84
3.17	Expression de l'ADNc RA-1 et purification des protéines de fusion et recombinante	85
3.18	Détection des anticorps dirigés contre la RA-1 de fusion et recombinante dans les sérums de patients rhumatoïdes et de témoins	87
3.19	L'antigène Sa versus la calpastatine	88
4.0	DISCUSSION ET CONCLUSION	91
5.0	TABLEAUX, FIGURES ET LÉGENDES	119
6.0	PUBLICATIONS ET RÉSUMÉS	190
7.0	REMERCIEMENTS	195
8.0	RÉFÉRENCES	198

LISTE DES ILLUSTRATIONS

<u>FIGURES</u>	<u>PAGES</u>
Figure 1: La synovite rhumatoïde.....	18
Figure 2: Représentation schématique du complexe trimoléculaire.....	20
Figure 3: Représentation schématique de la méthode de criblage d'une bibliothèque d'expression d'ADNc.....	51
Figure 4: Détection spécifique en immunobuvardage du polypeptide de 50 kD de l'ERH en utilisant des sérums rhumatoïdes anti-Sa.....	120
Figure 5: Immunobuvardage de l'ERH avec des conditions de séparation permettant une meilleure résolution des bandes.....	122
Figure 6: Criblage typique de sérums par immunobuvardage en utilisant l'ERH comme source antigénique.....	124
Figure 7: Détection de l'antigène Sa par immunobuvardage avec l'EPH semi-purifié, en utilisant des sérums anti-Sa.....	126
Figure 8: Criblage typique des anticorps anti-Sa dans les sérums de patients et de témoins par immunobuvardage.....	128
Figure 9: Détection spécifique de l'antigène Sa en immunobuvardage dans un extrait semi-purifié de tissu synovial rhumatoïde.....	130
Figure 10: Réactivité croisée de l'antigène Sa dans les extraits de rate, de synoviale et de placenta humains.....	132
Figure 11: Détection par immunobuvardage des anticorps anti-Sa dans les prélèvements de liquides synoviaux.....	134
Figure 12: Caractérisation isotypique des anticorps anti-Sa par immunobuvardage.....	136
Figure 13: Les anticorps anti-Sa ne sont pas associés au facteur rhumatoïde.....	138
Figure 14: Analyse comparative entre le système Sa et l'antigène RA33.....	140

Figure 15:	Analyse comparative entre les anticorps anti-EBNA et anti-Sa.....	142
Figure 16:	Les anticorps anti-Sa ne sont pas dirigés contre des composants du cartilage articulaire.....	144
Figure 17:	Caractérisation immunochimique de l'antigène Sa provenant d'espèces différentes.....	146
Figure 18:	Purification par HPLC et détection de l'antigène Sa isolé du placenta humain.....	148
Figure 19:	Analyse de l'EPH purifié par HPLC.....	150
Figure 20:	Analyse comparative des anticorps anti-Sa et anti-vimentine en immunobuvardage.....	152
Figure 21:	Absorptions des anticorps anti-Sa et anti-vimentine avec l'EPH ou avec la vimentine purifiée.....	154
Figure 22:	Isolement de l'ADNc de la PDI par PCR et analyse restrictive de la séquence de l'insert sou-cloné dans pUC19.....	156
Figure 23:	Analyse sur gel d'agarose de l'orientation de l'ADNc de la PDI dans le vecteur pGEX-KG via le site de restriction Pst I....	158
Figure 24:	Purification de la PDI recombinante exprimée dans le vecteur pGEX-KG analysée par SDS-PAGE et détection des anticorps anti-PDI par immunobuvardage.....	160
Figure 25:	Analyse en immunobuvardage de sérums anti-Sa et anti-PDI absorbés avec l'EPH ou avec la GST-PDI.....	162
Figure 26:	Fluctuation des anticorps anti-Sa à travers le temps et tout au long de l'activité de la maladie.....	164
Figure 27:	Détection et isolement du clone d'ADNc à partir de la bibliothèque d'expression de placenta humain avec des sérums de patients rhumatoïdes.....	166
Figure 28:	Séquençage nucléotidique de l'ADNc codant pour RA-1 et séquence peptidique correspondante.....	168
Figure 29:	Représentation schématique de l'ADNc codant pour la calpastatine humaine et du fragment RA-1 homologue.....	170

Figure 30:	Sous-clonage du fragment RA-1 dans le vecteur d'expression pGEX-4T-1 et analyse sur gel d'agarose de l'orientation de l'insert par digestion avec Pst I.....	172
Figure 31:	Analyse de la purification de la protéine recombinante exprimée dans pGEX-4T-1 par SDS-PAGE et par immunobuvardage.....	174
Figure 32:	Immunobuvardage typique de la réactivité de sérums rhumatoïdes et de témoins contre les polypeptides GST-RA-1 et RA-1r.....	176
Figure 33:	Analyse immunochimique de la réactivité croisée entre l'autoantigène Sa et le polypeptide RA-1r: expérience I.....	178
Figure 34:	Analyse immunochimique de la réactivité croisée entre l'autoantigène Sa et le polypeptide RA-1r: expérience II.....	180
Figure 35:	Représentation schématique de l'interaction entre l'autoanticorps, l'inhibiteur ciblé et l'enzyme protéolytique.....	112

<u>TABLEAUX</u>	PAGES
Tableau 1:	Analyse comparative de l'autoantigène Sa avec les HSP en immunobuvardage en utilisant différentes sources d'anticorps et d'antigènes..... 183
Tableau 2:	Homologies de séquences peptidiques de l'autoantigène Sa..... 184
Tableau 3:	Détection des anticorps anti-Sa dans les sérums de 482 patients atteints de maladies rhumatismales et de témoins..... 185
Tableau 4:	Anticorps anti-Sa dans des sous-groupes de polyarthrites rhumatoïde..... 186
Tableau 5:	Analyse comparative des anticorps anti-Sa et du facteur rhumatoïde pour le diagnostic de la polyarthrite..... 187
Tableau 6:	Anticorps anti-RA-1 dans les sérums de 97 patients atteints de maladies rhumatismales et de témoins.....188

Tableau 7:	Corrélation entre les anticorps anti-Sa et les anticorps anti-calpastatine en utilisant 97 sérums de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et de témoins.....	189
-------------------	---	------------

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET SYMBOLES

α :	Alpha
β :	Beta
δ :	Delta
γ :	Gamma
λ :	Lambda
Ac:	Anticorps
AChR:	Récepteur de l'acétylcholine
ACR:	<i>American College of Rheumatology</i>
ACV-EB:	Antigène de la capside du virus Epstein-Barr
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNdb:	Acide désoxyribonucléique double brin
AKA:	Anticorps anti-kératine
ANA:	Anticorps antinucléaires
ANCA:	Anticorps anti-cytoplasme de neutrophile
Anti-Sm:	Anticorps anti-Smith
APC:	Cellule présentatrice d'antigène
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ARNt:	Acide ribonucléique de transfert
ATCC:	<i>American Type Tissue Culture Collection</i>
BSA:	Albumine sérique bovine
Cellule B:	Lymphocyte originant de la moelle osseuse
Cellule T:	Lymphocyte thymodépendant
CIP:	Inhibiteurs de protéinases à cystéines
CLAP:	Chemostatin, Leupeptin, Antipain et Pepstatin
DEAE:	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
DM:	Dermatomyosite
dt:	Dithiothréitol
E:	Enzyme
EAE:	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
EBNA:	Antigène nucléaire du virus Epstein-Barr
EBV:	Virus de l'Epstein-Barr
ELISA:	Essai immunoenzymatique
EPH:	Extrait de placenta humain
ERH:	Extrait de rate humaine
ESH:	Extrait de synoviale humaine
FANA:	Facteur antinucléaire
FAP:	Facteur antipérinucléaire
Fc:	Portion constante de la chaîne lourde des immunoglobulines
FI:	Filament intermédiaire
FITC:	Isothiocyanate de fluorescéine

FR:	Facteur rhumatoïde (autoanticorps anti-(Fc) des IgG)
GM-CSF:	Facteur de stimulation de granulocyte/macrophage
GST-PDI:	PDI recombinante fusionnée à la glutathione S-transférase
GST-RA-1:	RA-1 recombinante fusionnée à la glutathione S-transférase
GST:	Glutathione S-transférase
HEL:	Lysozyme de l'oeuf
HLA:	Antigènes leucocytaires humains
hnRNP:	Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène
HPLC:	Chromatographie liquide haute performance
HSP:	Protéine de stress
I:	Inhibiteur
ICAM:	Molécule d'adhésion intercellulaire
ID:	Immunodiffusion
IFAC:	Immunofluorescence anti-complément
IFI:	Immunofluorescence indirecte
Ig:	Immunoglobuline (e.g. IgG, immunoglobuline de classe G)
IL-2R:	Récepteur de l'interleukine 2
IL:	Interleukine (e.g. IL-2)
INF:	Interféron
IPTG:	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LB:	Milieu Luria-Bertani
LED:	Lupus érythémateux disséminé
MBP:	Protéine basique de la myéline
MCTD:	Collagénoses mixtes
MG:	Myasthénie grave
MHC:	Molécule du complexe majeur d'histocompatibilité
MMP:	Métalloprotéinases
NK:	Cellule tueuse naturelle
OA:	Arthrose
PBS:	Tampon phosphate/saline
PCR:	Réaction de polymérase en chaîne / <i>Polymerase chain reaction</i>
PDI:	Protéine disulfide isomérase
PDIr:	Protéine disulfide isomérase recombinante
PM:	Polymyosite
PMSF:	Phénylméthylsulfonylfluorure
PR:	Polyarthrite rhumatoïde
PTH:	Phenylthiohydantion
PVDF:	Polyvinylidène difluorure
RA-1:	ADNc codant pour les domaines 3 et 4 de la calpastatine humaine
RA-1r:	RA-1 recombinante
RA33:	Antigène nucléaire de 33 kD (connu aussi comme hnRNP A2)
RANA:	Anticorps antinucléaire précipitant
RIA:	Essai radioimmunologique
RNP:	Ribonucléoprotéine
Sa:	Autoantigène Sa (identifié initialement par le sérum Savoie)

Scl:	Autoantigène associé à la sclérodermie
ScS:	Sclérodermie systémique
SDS–PAGE:	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
SS:	Syndrôme de Sjögren
THBG:	<i>Thyroid hormone binding globulin</i>
TBS:	Tampon Tris/saline
Tc:	Cellule T cytotoxique/suppressive (CD8 ⁺)
TCR:	Récepteur des cellules T
Th:	Cellule T auxiliaire (CD4 ⁺)
TNF:	Facteur de nécrose tumorale
TPO:	Thyroperoxydase
TSH:	Hormone stimulatrice de la thyroïde
TY:	Milieu Luria–Bertani 2 X
U:	Unité internationale
UCTD:	Collagénoses non différenciées
V:	Région variable

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**CARACTÉRISATION IMMUNOLOGIQUE ET MOLÉCULAIRE DE
SYSTÈMES AUTOIMMUNS ASSOCIÉS À LA POLYARTHRITE
RHUMATOÏDE**

par

Normand Després

Département de rhumatologie et Département de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

RÉSUMÉ

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire articulaire, dans laquelle la réponse autoimmune humorale semble importante pour le diagnostic de la maladie. Cette étude consiste à identifier de nouveaux autoantigènes et à caractériser leur implication possible dans la pathogénèse de la PR. En utilisant des extraits de rate (ERH) ou de placenta humains (EPH) semi-purifiés sur DEAE, des sérums de patients rhumatoïdes analysés en immunobuvardage ont identifié un nouveau système autoimmun (Sa/anti-Sa). Les sérums de 482 individus normaux ou souffrant de maladies rhumatismales diverses ont été testés en immunobuvardage afin de définir la spécificité des anticorps anti-Sa dans la PR. Les sérums de 42.7% (88/206) des patients rhumatoïdes ont détecté l'antigène Sa de 50 kD, incluant 29% (9/31) des patients en phase précoce de la maladie et 27% (17/63) des patients rhumatoïdes négatifs pour le facteur rhumatoïde. Les anticorps anti-Sa ont essentiellement été détectés dans les sérums de patients rhumatoïdes, avec une spécificité de 98.9%. Le système Sa est distinct des autres autoantigènes associés à la PR. Ceux-ci incluent le FR, les antigènes codés par le virus Epstein-Barr, le RA33, les composantes du cartilage articulaire, les protéines de stress bactériennes ou humaines et la filaggrine. Les autoanticorps anti-Sa sont principalement d'isotype IgG et ont révélé des titres variant entre 1/50 et 1/1000. Alors que l'antigène Sa est indétectable dans des extraits bruts de divers lignées cellulaires, il est présent dans des tissus humains normaux, tels que la rate et le placenta, et

particulièrement concentré dans le tissu synovial rhumatoïde. Des expériences de réactivité croisée avec des anticorps purifiés ont montré que l'antigène Sa possède des épitopes communs entre ces trois extraits tissulaires. Les anticorps anti-Sa sont également présents dans les liquides synoviaux prélevés de patients rhumatoïdes anti-Sa positifs. L'analyse de sérums sériés de quelques patients a montré que le titre des anticorps anti-Sa varie avec l'activité de la maladie. À la suite de la purification de l'EPH par chromatographie d'échange d'ions en gradient sur HPLC, l'antigène Sa élue à 240 mM de NaCl et trois bandes polypeptidiques non glycosylées de 53, 50 et 49 kD ont été obtenues par SDS-PAGE. Des déterminants antigéniques identiques entre chacune des bandes polypeptidiques ont été observés à l'aide d'anticorps purifiés, suggérant une dégradation protéolytique au cours de l'extraction et de la purification ou un partage antigénique entre des protéines de poids moléculaires distincts. Le microséquençage des bandes de 50 et 49 kD a révélé une homologie de 62.5% sur 16 résidus d'acides aminés avec la vimentine humaine. Des expériences comparatives ont démontrées que la vimentine n'est pas identique à l'antigène Sa. Premièrement, la vimentine purifiée n'est pas reconnue par la plupart des sérums anti-Sa positifs. Deuxièmement, aucun partage antigénique n'a été observé à la suite d'absorptions croisées de sérums anti-Sa ou anti-vimentine positifs avec l'antigène Sa placentaire et la vimentine purifiée. Le microséquençage de la bande polypeptidique de 53 kD a démontré une homologie parfaite sur 20 résidus d'acides aminés avec la sous-unité β de la prolyl 4-hydroxylase, connue aussi sous le nom de protéine disulfure isomérase (PDI). L'ADNc de la PDI isolé par réaction en chaîne de polymérase a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pGEX-KG afin d'analyser l'immunoréactivité de sérums anti-Sa avec la protéine recombinante (PDIr). Plusieurs sérums rhumatoïdes et non-rhumatoïdes ont détectés la PDIr en immunobuvardage. De plus, des absorptions de sérums avec la PDIr n'ont pas inhibé la réactivité contre l'antigène Sa, suggérant l'absence d'un partage antigéniques entre l'antigène Sa et la PDIr. Malgré sa non-spécificité, la réponse autoimmune contre la PDIr fera l'objet d'études ultérieures.

En criblant une librairie d'expression de placenta humain dans le vecteur λ gt11 avec un pool de sérums rhumatoïdes pré-sélectionnés selon des critères stricts de sérologie autoimmune, nous avons identifié et cloné un ADNc (RA-1) codant pour une portion de la calpastatine humaine. La calpastatine est l'inhibiteur naturel des calpaïnes, des protéinases à cystéine activées par le Ca^{++} . Les calpaïnes sont impliquées d'une part dans la transmission de signaux intracellulaires et d'autre part dans la destruction du tissu conjonctif et de la matrice du cartilage articulaire. Le fragment cloné est de 950 pb et code pour un polypeptide recombinant de 284 acides aminés, avec un poids moléculaire de 35.9 kD. La séquence nucléotidique du clone RA-1 s'est avérée entièrement homologue à l'ADNc codant pour deux domaines en COOH-terminal de la calpastatine humaine. Chacun des deux domaines codés par RA-1 contient une séquence consensus associée à l'activité inhibitrice de la calpastatine. L'ADNc du clone RA-1 a ensuite été sous-cloné dans un système d'expression procaryote, en utilisant le vecteur pGEX-4T-1 qui code pour la glutathione S-transférase comme protéine porteuse et pour un site de clivage par la thrombine afin d'isoler la protéine recombinante (RA-1r). L'analyse en immunobuvardage de sérums rhumatoïdes et témoins révèle que 21/44 (45.5%) des sérums de PR détectent spécifiquement la protéine RA-1r, contrairement à 2/43 (4.7%) des sérums de patients témoins non rhumatoïdes et aucun de 10 individus normaux.

En conclusion, nous avons identifié et caractérisé deux nouveaux marqueurs spécifiquement associés à la PR, l'antigène Sa et la calpastatine, et nous avons étudié deux autres marqueurs non spécifiques, la PDI et la vimentine. L'antigène Sa représente un marqueur diagnostique potentiel pour la PR. Sa nature moléculaire et son rôle potentiel dans la pathogénèse de la maladie inflammatoire articulaire chronique mérite d'être exploré plus en profondeur. D'autre part, les autoanticorps anti-calpastatine peuvent également agir comme marqueur spécifique dans les

formes érosives d'arthrites chroniques. La réponse de patients rhumatoïdes contre la calpastatine suggère une implication pathogénique possible des autoanticorps anti-calpastatine, via la formation de complexes immuns au site même de l'inflammation ou via un mécanisme d'interférence immune en bloquant le pouvoir inhibiteur de la calpastatine sur les calpaïnes. Des expériences de liaison et d'inhibition *in vitro*, devront faire l'objet d'études futures afin de confirmer cette hypothèse. Les protocoles d'absorptions croisées entre les antigène Sa et calpastatine suggèrent que ces deux autoantigènes sont distincts du point de vue moléculaire mais semblent partager des déterminants antigéniques communs. L'évaluation prospective de la réponse autoimmune dirigée contre l'antigène Sa et contre la calpastatine devrait être étudiée afin de faire valoir davantage leurs potentiels diagnostiques et/ou pronostiques dans la PR.

INTRODUCTION

Le système immunitaire des mammifères est organisé de façon à être capable de discriminer entre les composantes du soi et du non soi, et cela en faisant face à deux problèmes majeurs: 1) éviter de réagir de façon destructive contre les composantes du soi et 2) réagir massivement contre une multitude de molécules étrangères provenant de microorganismes en constante évolution. Dans certains cas, l'élimination de cellules autoréactives au niveau thymique n'est pas complète et plusieurs mécanismes peuvent agir en périphérie afin d'induire et de contrôler une réponse autoimmune potentiellement nuisible pour l'organisme. La polyarthrite rhumatoïde (PR) fait partie des maladies autoimmunes les plus communes. La PR est un désordre inflammatoire chronique affectant les articulations de même que de multiples organes. Le processus inflammatoire de l'articulation implique principalement la membrane synoviale et les diverses composantes articulaires. Ce processus inflammatoire mène progressivement à la destruction de l'articulation via la présence d'un grand nombre de médiateurs inflammatoires, de réponses immunes cellulaires et humorales anormales, de même que d'une hyperplasie synoviale. Ni l'étiologie, ni la pathogénèse de la maladie ne sont connues avec certitude. L'implication de l'immunité à médiation cellulaire et humorale dans l'inflammation et la destruction articulaire est également peu connue. Une approche importante pouvant mener à la compréhension des causes et des conséquences de maladies autoimmunes, telles que la PR, est d'identifier des déterminants antigéniques reconnus spécifiquement par des autoanticorps circulants. L'objet de cette étude a été de caractériser la réponse autoimmune humorale contre des autoantigènes pouvant être associés à la PR. Avant de comprendre et d'expliquer le processus de la réponse autoimmune présentée ici, il est toutefois nécessaire de se référer d'abord à des études et à des théories concernant les mécanismes de l'autotolérance immunitaire de même que de l'autoimmunité.

1.1 AUTOTOLÉRANCE IMMUNITAIRE

La capacité de distinguer entre les composantes du soi et les antigènes exogènes est à la base de la reconnaissance immune. Ce processus de discrimination permet à l'organisme d'acquérir une immunité contre les agents étrangers ou envahisseurs, en évitant par le fait même de développer une réponse autoimmune destructive. Plusieurs études récentes sur les processus de discrimination entre le soi et le non soi (Blackman et al., 1990; von Boehmer et Kisielow, 1990; Goodnow et al., 1990; Kroemer et Martínez-A., 1992) ont confirmé la théorie proposée par Burnet sur la sélection clonale (Burnet, 1957). Cette hypothèse est appuyée par deux mécanismes majeurs. Le premier est le développement d'une réponse immune contre des antigènes étrangers en déclenchant une prolifération et une différenciation de clones de lymphocytes T et B spécifiques. Le second est l'induction d'une tolérance immune face aux autoantigènes par l'élimination ou l'inactivation des cellules autoréactives. Ces deux mécanismes sont aujourd'hui connus sous les termes de sélection positive (von Boehmer, 1994) et de sélection négative des lymphocytes (Nossal, 1994), respectivement. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'autotolérance sont actuellement controversés et restent encore à être mieux définis (Cohen et Young, 1991; Matzinger, 1994). La clarification future de ces mécanismes de sélection lymphocytaire constituera un pas majeur dans le contrôle de réponses immunes diverses telles que le rejet de greffe, de même que dans la compréhension de la rupture de l'autotolérance menant aux maladies autoimmunes.

L'induction de la tolérance immune des cellules autoréactives s'effectue tant au niveau intrathymique que périphérique. Trois mécanismes de sélection négative ont jusqu'à maintenant été considérés comme mutuellement exclusifs dans l'acquisition de la tolérance immunitaire: la délétion clonale, l'inactivation clonale et l'immunorégulation de cellules T et B potentiellement autoréactives.

1.1.1 Sélection négative des cellules T

Au cours de la différenciation intrathymique, les thymocytes qui expriment des récepteurs de cellules T (TCR) de haute affinité pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) présentant des peptides du soi sont physiquement éliminés (Sprent et Webb, 1987; Blackman et al., 1990; Hartwig, 1993; Swat et al., 1994). Ces complexes MHC-peptide sont présentés par les cellules épithéliales thymiques et par les cellules dendritiques dérivant de la moelle osseuse (Elliott, 1993; Miller et Heath, 1993; Nossal, 1994). Bien que la délétion clonale soit préférentiellement associée aux thymocytes pouvant réagir à de faibles concentrations d'antigènes (Pircher et al., 1991), des travaux récents ont démontré l'élimination de cellules T au niveau périphérique (Webb et al., 1990; Kawabe et Ochi, 1991; Arnold et al., 1993). Des études importantes ont été effectuées à l'aide de systèmes impliquant les superantigènes ou des souris transgéniques et ont mis en évidence l'élimination clonale de cellules T auxiliaires CD4⁺ (Th) au niveau thymique (Marrack et al., 1993). À l'aide de modèles de souris transgéniques, il a été clairement démontré que les cellules T cytotoxiques CD8⁺ reconnaissant spécifiquement le complexe MHC classe I-peptide du soi sont inactivées puis éliminées (Hämmerling et al., 1993). De plus, les cellules tueuses naturelles ("natural killer": NK) autoréactives sont sélectivement éliminées ou inactivées au cours de la différenciation afin de prévenir une lyse des cellules autologues normales (Liao et al., 1991; Ciccone et al., 1994; Trinchieri, 1994).

D'autre part, lorsque les cellules autoréactives échappent à la délétion clonale, elles peuvent être activées par les autoantigènes puis devenir temporairement incompetentes du point de vue fonctionnel. Ces mécanismes se rapportent à l'inactivation clonale et semblent être indispensables au niveau de la tolérance périphérique (Ramsdell et Fowlkes, 1990; Rocha et von Boehmer, 1991; Yui et al.,

1994). Un modèle *in vitro* d'inactivation clonale a récemment été développé et a démontré que les cellules T stimulées par un autoantigène ou par un complexe MHC-peptide, en absence d'un "signal de co-stimulation", sont incapables de produire de l'interleukine 2 (IL-2), bloquant par le fait même la stimulation autocrine entre l'IL-2 et son récepteur (IL-2R) (Jenkins et Schwartz, 1987; Schwartz, 1990; Quill et al, 1994). Un autre mécanisme impliqué dans l'inactivation clonale est la régulation de l'expression du TCR (Teh et al., 1989) et/ou du CD8 (Lamb et al., 1987; Schönrich et al., 1991) à la surface de cellules T spécifiques pour un autoantigène. Ce mécanisme assure donc la tolérance de cellules T CD8⁺ dans le contexte d'autoantigènes présentés par des molécules du MHC de classe I. De plus, les cellules épithéliales thymiques peuvent elles-mêmes induire les cellules T en cours de différenciation à être dans un état d'inactivation (Hämmerling et al., 1993). Contrairement à la délétion clonale, l'état d'inactivation clonale peut être réversible dans certaines conditions (Lo et al, 1991).

Les cellules T autoréactives qui ont contourné les processus de délétion et d'inactivation clonales peuvent être contrôlées via divers mécanismes d'immunosuppression (Green et Webb, 1993). Ceux-ci incluent d'une part des mécanismes d'immunosuppression non-spécifiques par les glucocorticoïdes (Kroemer, 1988) et les cytokines (Dallman et al., 1993) et d'autre part, des mécanismes d'inhibition spécifique par les cellules T suppressives (Tada et al, 1991; Dorf et al, 1992), par des facteurs de suppression spécifique d'antigène (Green et Webb, 1993) et par des interactions idiotypiques impliquant le TCR et/ou les immunoglobulines (Pereira et al, 1989; Cohen et Young, 1991; Avrameas, 1991). Comme dernier mécanisme d'autotolérance, les cellules T devenues tolérantes à des peptides spécifiques d'un tissu ou d'un organe donné doivent demeurer à l'intérieur de leurs compétences topographiques (Kroemer et al., 1993).

1.1.2 Sélection négative des cellules B

Bien que la réponse immune des cellules B soit souvent T-dépendante, la tolérance immune des cellules T n'est pas suffisante pour obtenir une protection efficace contre l'autoimmunité. Les cellules B autoréactives doivent également être soumises à des mécanismes de sélection négative via les processus de délétion, d'inactivation et d'immunosuppression (Basten et al, 1991; Goodnow, 1992b; Nossal, 1994). Les mécanismes de sélection clonale exercent une influence continue sur les cellules B, à partir du moment où elles expriment des Ig de surface jusqu'à la fin de leur différenciation en plasmocytes (Schwartz et Stollar, 1994). Plusieurs de ces mécanismes ont été démontrés à l'aide de modèles transgéniques exprimant des anticorps dirigés contre des autoantigènes (Goodnow, 1992a), par exemple l'élimination de cellules B exprimant des autoanticorps anti-ADN (Chen et al., 1994). Les cellules B dirigées spécifiquement contre des antigènes membranaires présents à haute concentration, tant au niveau de la moelle osseuse qu'en périphérie, sont éliminées par délétion clonale (Nemazee et al., 1989a et 1989b; Hartley et al, 1991, 1993; Tiegs et al, 1993). Toutefois, lorsque l'autoantigène est exprimé à très faible concentration, seules les cellules T sont tolérantes (Adelstein et al 1991). De plus, les cellules B autoréactives contre des autoantigènes solubles peuvent être inactivées et par conséquent, perdre temporairement leur capacité de produire et de sécréter des anticorps (Goodnow et al., 1988; Basten et al., 1991). Dans le cas de cellules B inactivées par le lysozyme d'oeuf ("hen egg lysozyme"; HEL), l'état d'inactivation peut devenir réversible lorsque ces cellules B sont transférées dans un milieu en absence d'antigène (Goodnow, 1991). Il est toutefois important de noter que ces processus de délétion et d'inactivation ne sont pas simplement dus à une affinité intrinsèque différente contre l'autoantigène puisque la conversion d'un antigène soluble, tel le HEL, en un antigène associé à la membrane provoque la délétion clonale des cellules B anti-HEL (Hartley et al, 1991). Le mécanisme de

délétion clonale est plutôt associé au potentiel d'interaction entre les récepteurs autoréactifs et les autoantigènes membranaires. Les cellules B autoréactives peuvent également être immunosupprimées par des cellules T immatures via le complexe MHC-peptide (Takahashi et al., 1990). La production et la sécrétion d'autoanticorps peuvent aussi être bloquées en absence de stimulation par les cellules T auxiliaires (Hodgkin et al., 1991). Finalement, des études proposent que les cellules B autoréactives peuvent être régulées via le réseau idiotype/anti-idiotype (Coutinho et al., 1989; Avrameas, 1991).

Il existe également une certaine complicité entre les cellules T et B dans le contrôle de la tolérance immunitaire. Les cellules B rendues inactives peuvent capturer, processor et présenter un autoantigène aux cellules Th afin d'induire une inactivation spécifique (Parker et Eynon, 1991; Eynon et Parker, 1992, 1993). D'autre part, les cellules T inactives semblent jouer un rôle immunosuppresseur important dans l'induction de l'autotolérance des cellules B, mais les mécanismes sont encore peu connus (Parker et Eynon, 1991). Des travaux récents proposent un rôle majeur des immunoglobulines de surface dans le contrôle des réponses humores T-dépendantes et suggèrent que la régulation des signaux de transduction par ces immunoglobulines fournirait un mécanisme de contrôle des cellules B autoréactives (Cooke et al., 1994). Certaines évidences expérimentales ont aussi démontré l'immunosuppression des cellules B par des cellules T suppressives (Takahashi et al., 1990; Dorf et al., 1992). Finalement, des études ont proposé que les cellules T autoréactives peuvent être contrôlées par le réseau idiotypique via les anticorps ou les cellules B elles-mêmes (Pereira et al., 1989; Petrányi, 1992).

1.2 AUTOIMMUNITÉ

Une fois les mécanismes de la tolérance immune mis en place à l'intérieur de l'organisme, il est évident que l'ensemble de ces processus doit être interprété comme de multiples verrous de sécurité afin de prévenir une réponse autoagressive. L'incapacité du système immunitaire à tolérer un ou plusieurs des autoantigènes, par la rupture des mécanismes de l'autotolérance, peut résulter en un état autoimmun menant à des conséquences pathologiques graves et parfois à la mort (Kroemer et Martínez-A, 1991; Kronenberg, 1991; Steinman, 1993). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer l'induction de manifestations autoimmunes (Nakamura et Binder, 1988; Steinberg et al., 1990; Yeatman et al., 1992; Nakamura et Nakamura, 1992; Rose et Bona, 1993; Matzinger, 1994).

1.2.1 Mécanismes associés à la rupture de l'autotolérance

Des facteurs génétiques, immunologiques, hormonaux de même qu'environnementaux semblent être impliqués dans l'induction, le développement et la pathogénèse des maladies autoimmunes (Sinha et al., 1990; Steinman, 1993). Même si d'innombrables études suggèrent une étiologie autoimmune multifactorielle, le/les mécanismes précis impliqués dans la rupture de l'autotolérance sont encore très peu connus. Plusieurs processus semblent être engagés dans l'induction d'une réponse autoimmune : (1) la présence de molécules du MHC associées à la susceptibilité génétique de maladies autoimmunes (Tiwari et Terasaki, 1985; Möller et al., 1990; Altmann et al., 1991; Schwartz, 1994). Ces molécules doivent être capables de lier et de présenter un autoantigène, de même que de sélectionner de façon positive et d'activer les cellules T autoréactives; (2) l'existence de cellules T ou B autoréactives ayant échappé à l'élimination clonale au niveau thymique ou périphérique; (Nagy et al., 1989; Schild et al., 1990; Gay et al., 1993); (3) la stimulation de cellules autoréactives par des autoantigènes ou des déterminants

n'ayant jamais été mis en contact avec le système immunitaire, i.e. non tolérés (Bottazzo et al., 1983; Gammon et al., 1991; Lin et al., 1991; Mamula et al., 1992; Mamula, 1993; Mamula et al., 1994). Ces autoantigènes peuvent provenir de déterminants cryptiques, de molécules séquestrées ou d'une expression ectopique de molécules du MHC de classe II à la surface de cellules non lymphoïdes; (4) le dérèglement de la production de cytokines et de signaux de costimulation nécessaires pour l'activation de cellules T et B autoréactives (Rubin et Nelson, 1990; Schattner, 1994; Cavallo et al., 1994; Paul et Seder, 1994); (5) l'absence de signaux indispensables à l'inactivation ou à la suppression des cellules autoréactives non délétées (Schwartz, 1992); (6) le dérèglement de gènes (Fas/Apo-1 et Bcl-2) impliqués dans le contrôle de l'apoptose pouvant programmer la mort cellulaire et provoquer l'autoimmunité (Strasser et al., 1991; Sentman et al., 1991; Carsciola-Rosen et al., 1994; Tan, 1994; Rose et al., 1994); et (7) la présence de facteurs environnementaux pouvant déclencher l'autoimmunité (Cohen et Young, 1991). Ces facteurs, tels que bactéries, virus ou toxines, peuvent permettre la libération d'autoantigènes séquestrés au niveau du tissu cible, induire une inflammation locale entraînant la libération de cytokines, et initier une réponse autoimmune indirecte via un mimétisme moléculaire, i.e. avec des déterminants antigéniques identiques ou similaires entre l'agent pathogène et l'hôte (Oldstone, 1987). De plus, les superantigènes bactériens peuvent jouer un rôle important dans l'activation de cellules T autoréactives, en absence de présentation de peptides immunodominants par le MHC (Herman et al., 1991). Ces mécanismes d'activation ont été récemment confirmés dans le modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) à l'aide de l'entérotoxine staphylococcale (Brocke et al, 1993; Schiffenbauer et al., 1993).

Malgré une compréhension croissante des mécanismes d'induction de l'autotolérance de même que des mécanismes possibles conduisant à l'autoimmunité, l'immunologie est toujours ignorante en ce qui concerne le ou les processus précis qui provoquent une réponse autoagressive chez l'humain. Il n'est pas encore évident si la réponse autoimmune est due à un dérèglement du système immunitaire au niveau périphérique (Wekerle et Lassmann, 1994) ou à des agents pathogéniques pouvant détruire un tissu ou un organe spécifique, exposant ainsi des autoantigènes non tolérés (Wilkin, 1994).

1.2.2 Maladies autoimmunes

Les maladies autoimmunes humaines peuvent être classifiées de plusieurs manières (Sinha et al., 1990). Premièrement, la susceptibilité génétique au développement de ces maladies est contrôlée par les gènes codés par le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), particulièrement par les molécules du MHC de classe I (HLA-A, B, C) et de classe II (Ia, HLA-D). Les maladies associées aux molécules de classe I représentent un petit groupe, notamment les spondyloarthropathies liées au HLA-B27 et le psoriasis vulgaris lié au HLA-B13, 16 et 17. Deuxièmement, à l'intérieur du groupe le plus important, i.e. les maladies associées au MHC de classe II, les désordres autoimmuns sont subdivisés en deux grandes familles: les maladies autoimmunes spécifiques d'organe (Bottazzo et al., 1986) et les maladies autoimmunes systémiques (Nakamura et Binder, 1988). Troisièmement, les maladies autoimmunes peuvent également être classifiées selon le mode d'action de la réponse autoagressive. Certaines maladies autoimmunes sont médiées par l'action des cellules T (surtout via les cellules CD4⁺), tandis que d'autres sont le résultat d'autoanticorps spécifiques via une action directe sur la fonction de l'autoantigène ou via le dépôt de complexes immuns au niveau de l'organe ou du tissu cible (Naparstek et Plotz, 1993). Outre la susceptibilité associée aux molécules du MHC, d'autre

facteurs génétiques, environnementaux et développementaux doivent agir comme facteurs permissifs dans l'initiation et le maintien de la réponse autoimmune. Certains gènes de la région variable du TCR sont associés à certaines maladies autoimmunes, par exemple. En raison de cette implication multigénique, plusieurs individus peuvent posséder certains gènes associés à la susceptibilité sans développer la maladie. L'initiation et le développement de réponses autoaggressives repose donc sur un polymorphisme génétique qui jouera un rôle capital dans la susceptibilité de maladies autoimmunes.

1.2.3 Maladies autoimmunes spécifiques d'organe

Ces désordres inflammatoires chroniques se caractérisent principalement par une réponse autoimmune contre un autoantigène présent uniquement au niveau de l'organe cible. Parmi les maladies les plus étudiées, mentionnons le diabète autoimmun, la thyroïdite autoimmune et la myasthénie grave. Le diabète mellitus insulino-dépendant est un exemple type de maladie autoimmune spécifique d'organe résultant de la rupture de l'autotolérance périphérique (Somoza et al., 1994). La maladie semble être contrôlée surtout via l'action des cellules CD4⁺ autoréactives au niveau du tissu cible (Leiter, 1989). Les patients souffrant de diabète méllitus possèdent toutefois des autoanticorps dirigés contre l'insuline (Taylor et al., 1989; Pugliese et al., 1994) et contre certaines composantes des cellules β des îlots de Langerhans (Baekkeskov et al., 1988; Atkinson et al., 1990; Christie et al., 1993; Pietropaolo et al, 1993; Schatz et al., 1994). La décarboxylase de l'acide glutamique semble être l'autoantigène immunodominant dans cette réponse autoimmune (Baekkeskov et al, 1990; Christgau et al, 1991; Kaufman et al, 1992; Richter et al., 1993). La thyroïde est également atteinte dans certaines maladies autoimmunes spécifiques d'organe (Rose, 1991). La thyroïdite d'Hashimoto est une forme d'hypothyroïdisme, tandis que la maladie de Grave est une forme

d'hyperthyroïdisme. Trois autoantigènes associés aux thyroïdites autoimmunes ont été décrits: la thyroperoxydase (TPO), la thyroglobuline et le récepteur de l'hormone stimulatrice de la thyroïde (TSH) (Bottazzo et al, 1986; Naparstek et Plotz, 1993). Les anticorps anti-thyroglobuline sont détectés chez les patients souffrant de thyroïdite d'Hashimoto (Hexham et al, 1991), tandis que les anticorps dirigés contre le récepteur de la TSH semblent être associés à la maladie de Grave (Nagayama et Rapoport, 1992). Les anticorps anti-TPO sont toutefois détectés dans l'ensemble des patients (Doullay et al, 1991; Chazenbalk et al., 1993). Jusqu'à présent, les anticorps anti-récepteur de la TSH (Burman et Baker, 1985) et les anti-TPO (McLachlan et Rapoport, 1992) semblent avoir un rôle pathogénique dans le développement de la thyroïdite autoimmune. La myasthénie grave (MG) est une autre forme importante de maladie autoimmune spécifique d'organe avec une réponse autoagressive contre le récepteur de l'acétylcholine (AChR) (Schonbeck et al., 1990). Bien que des cellules T CD4⁺ soient dirigées contre des épitopes immunodominants (Moiola et al, 1994), la MG est principalement caractérisée par la présence d'autoanticorps anti-AChR (Patrick et Lindstrom, 1973). Ces autoanticorps sont détectés spécifiquement dans plus de 85% des patients et semblent agir dans la pathogénèse et la sévérité de la maladie en interférant directement avec les fonctions du récepteur de même que de la transmission nerveuse (Fambrough et al., 1973; Lindstrom et al., 1976; Guyon et al., 1994). Des études plus approfondies ont démontré que la sous-unité α du AChR constitue l'épitope majeur reconnu par ces autoanticorps (Barkas et al., 1988; Tzartos et al., 1988). La possibilité que la sclérose en plaques humaine soit due à une réponse autoimmune contre la protéine basique de la myéline (MBP) est toujours incertaine (Allegretta et al., 1990; Kronenberg, 1991). Toutefois, à l'étude de modèles expérimentaux d'encéphalomyélite autoimmune, la réponse immune est spécifiquement dirigée contre certains épitopes de la MBP (McFarlin et MacFarland,

1983; Zamvil et al., 1985; Wucherpfennig et al., 1991; Gautam et al., 1992; French-Constant, 1994). D'autre part, la cirrhose biliaire primaire est aussi une maladie autoimmune spécifique d'organe affectant le foie et caractérisée par la présence d'autoanticorps anti-mitochondries, où l'autoantigène majeur est la sous-unité E2 de la pyruvate déshydrogénase (Cha et al, 1993). Finalement, pour ne pas toutes les nommer, plusieurs autres maladies autoimmunes spécifiques d'organe sont en cours de caractérisation en ce qui concerne la réponse autoagressive des cellules T et B, le/les autoantigènes détectés, les facteurs génétiques et environnementaux, de même que l'étude de modèles expérimentaux.

1.2.4 Maladies autoimmunes systémiques

Les désordres autoimmuns systémiques sont caractérisés par une réponse autoimmune contre des autoantigènes présents dans plusieurs organes cibles, voire même dans l'ensemble de l'organisme. La réponse autoimmune systémique se démarque principalement par la présence d'une grande variété d'autoanticorps spécifiques dirigés contre des molécules nucléaires et cytoplasmiques (McCarty et al., 1984; Tan, 1989; Zieve et Sauterer, 1990; Saitta et Keene, 1992; Warner, 1994). Ces autoantigènes sont impliqués dans des fonctions cellulaires fondamentales telles que la transcription, l'épissage du précurseur de l'ARN messager, la réplication de l'ADN, la division cellulaire et la traduction de l'ARN messager. Les manifestations diverses de l'autoimmunité systémique peuvent être le résultat d'un effet direct de ces autoanticorps, d'un dépôt de complexes immuns au niveau de l'organe cible ou de l'action de cellules T autoréactives.

De toutes les maladies autoimmunes systémiques, le lupus érythémateux disséminé (LED) est sans doute le désordre inflammatoire le plus étudié et le mieux connu jusqu'à présent. Le LED fait partie des maladies autoimmunes les plus sévères et

dévastatrices, avec des manifestations atteignant une multitude d'organes. Il est caractérisé par plusieurs manifestations cliniques, incluant le rash cutané, la sérosite, la néphrite, la thrombocytopénie, la leucopénie et des atteintes du système nerveux central (Steinberg et Klinman, 1988). Même si la pathogénèse de la maladie est toujours inconnue, des caractéristiques génétiques et immunopathologiques commencent à émerger tant à l'étude des patients atteints de LED que des modèles expérimentaux murins (Steinberg et al., 1990, 1991; Reveille, 1991; Mountz et al., 1991). Plusieurs évidences suggèrent que le lupus dépend principalement d'une hyperactivité de la réponse humorale entraînant le dépôt de complexes immuns formés par les autoanticorps (Theofilopoulos et Dixon, 1981; Tan, 1991). La présence de cellules T autoréactives semble contribuer indirectement dans la pathogénèse de la maladie en fournissant de l'aide aux cellules B sécrétrices d'autoanticorps tout en étant incapable de supprimer la réponse autoréactive (Tsokos et Balow, 1984; Morimoto et al., 1987; Takeuchi et al., 1988; Linker-Israeli et al., 1990; Handwerger, 1991; Rozzo et al., 1994). Parmi la variété d'autoanticorps identifiés dans les sérums de patients atteints de LED (Tan, 1989), les plus communs sont: les anticorps anti-ADN double brin associés spécifiquement au LED et possiblement impliqués dans la pathogénèse de la maladie (Schwartz et Stollar, 1985; Tan, 1991; Shuster et al., 1992; Reichlin et al., 1994); les anticorps anti-histones (Fritzler et Tan, 1978; Gohill et al., 1985; Portanova et al., 1987; Burlingame et al., 1994); les anticorps anti-Sm dirigés contre les ribonucléoprotéines (RNPs) nucléaires U1, U2, U4-U6, responsables de l'épissage des ARNm précurseurs (Lerner et Steitz, 1979; Rokeach et al., 1988; Craft, 1992); et les anticorps anti-RNPs cytoplasmiques dirigés contre le SS-A/Ro de 52 kD (Ben-Chetrit et al., 1988; Buyon et al., 1994; Frank et al., 1994), le SS-A/Ro de 60 kD (Reichlin et al., 1989; Ben-Chetrit et al., 1989; Boire et Craft, 1989; Habets et al., 1990), de même que le SS-B/La (Chambers et Keene, 1985; Bini et al., 1990; Weng

et al., 1993). Le syndrome anti-phospholipide caractérisé par la présence d'anticorps anti-cardiolipin et anti-coagulant lupique peut survenir seul ou être associé au LED (McNeil et al., 1991; Asherson et Cervera, 1992; Warner, 1994). Récemment, des études sur le lupus ont fait l'objet d'observations intéressantes pour la compréhension de la réponse autoimmune contre certains des autoantigènes lupiques, entre autres, le regroupement physique et l'oxydation d'autoantigènes à la surface de cellules impliquées dans l'apoptose (Casciola-Rosen et al., 1994; Tan, 1994) et l'induction d'une réponse autoimmune contre la p53, protéine exprimée via le gène de suppression tumorale (Dong et al., 1994).

Le syndrome de Sjögren (SS) est également un désordre autoimmun systémique affectant principalement les glandes salivaires, avec des atteintes hépatiques, rénales, hormonales, dermatologiques et nerveuses. Parallèlement au profil sérologique du LED, les patients atteints du SS possèdent typiquement des autoanticorps dirigés contre les RNPs SS-A/Ro et SS-B/La (Harley et al., 1986; Tsuzaka et al., 1994).

Brièvement, les autres maladies autoimmunes systémiques les plus courantes sont: la sclérodémie associée à la présence d'autoanticorps dirigés contre l'ADN topoisomérase I (Scl-70) impliquée dans la relaxation de l'ADN superenroulé (Tsay et al., 1990; Hietarinta et al., 1994; McHugh, 1994), contre des peptides centromériques (Moroi et al., 1980; Earnshaw et Rothfield, 1985; Earnshaw et al., 1987; Saitoh et al., 1992), et contre un antigène nucléolaire nommé PM/Scl détecté par les sérums de patients atteints du syndrome polymyosite-sclérodémie (Oddis et al., 1992; Blüthner et Bautz, 1992); les myosites (polymyosite/dermatomyosite) se caractérisent principalement par la présence d'autoanticorps dirigés contre les ARNt synthétases, dont les plus communs sont les anti-Jo-1 dirigés contre l'histidyl-

ARNt synthétase (Targoff, 1993); et les syndrômes vasculitiques, particulièrement la granulomatose de Wegener, caractérisés par la présence d'autoanticorps dirigés contre des composantes du cytoplasme des neutrophiles ("*anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*": ANCA) (van der Woude et al., 1985; Lock, 1994; Jennette, 1994): plus spécifiquement contre la myéloperoxydase (Falk et Jenette, 1988; Goldschmeding et al., 1988; Cambridge et al., 1994) et contre la protéinase-3 (myéloblastine), protéinase à sérine de 29 kD (Goldschmeding et al., 1989; Campanelli et al., 1990; Labbaye et al., 1991; Dalpé et al., 1993; Williams RC et al., 1994).

1.3 LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

Du point de vue historique, la première description des manifestations cliniques de la PR a été effectuée par Landre-Beauvais en 1800 (Parish, 1963). Le terme *polyarthrite rhumatoïde* a toutefois été adopté officiellement en 1941 par l'*American Rheumatism Association*. Bien que l'étiologie de la maladie soit encore obscure, la PR est considérée aujourd'hui comme un prototype de maladie autoimmune systémique (Sinha et al., 1990; Harris, 1990; Zvaifler, 1993; Sewell et Trentham, 1993; Winchester, 1994). La PR est un désordre inflammatoire chronique hétérogène, affectant environ 1 à 2% de la population. La réponse inflammatoire implique principalement la membrane synoviale et les diverses composantes des articulations. À travers l'évolution de la maladie, plusieurs cellules inflammatoires envahissent la synoviale et de multiples enzymes sont relâchées d'une façon incontrôlable. Ces processus inflammatoires entraînent la formation d'un pannus de même que la destruction irréversible de l'articulation (Figure 1). Les caractéristiques immunopathogéniques de la PR suggèrent fortement une implication importante des cellules T CD4⁺ dans la réponse immune pathogénique et un rôle déterminant des molécules du MHC de classe II dans la susceptibilité au développement de la

maladie (Winchester, 1994). Toutefois, la spécificité de l'autoréactivité, cellulaire et humorale, contre un peptide antigénique "X" (endogène ou exogène) n'est actuellement qu'hypothétique.

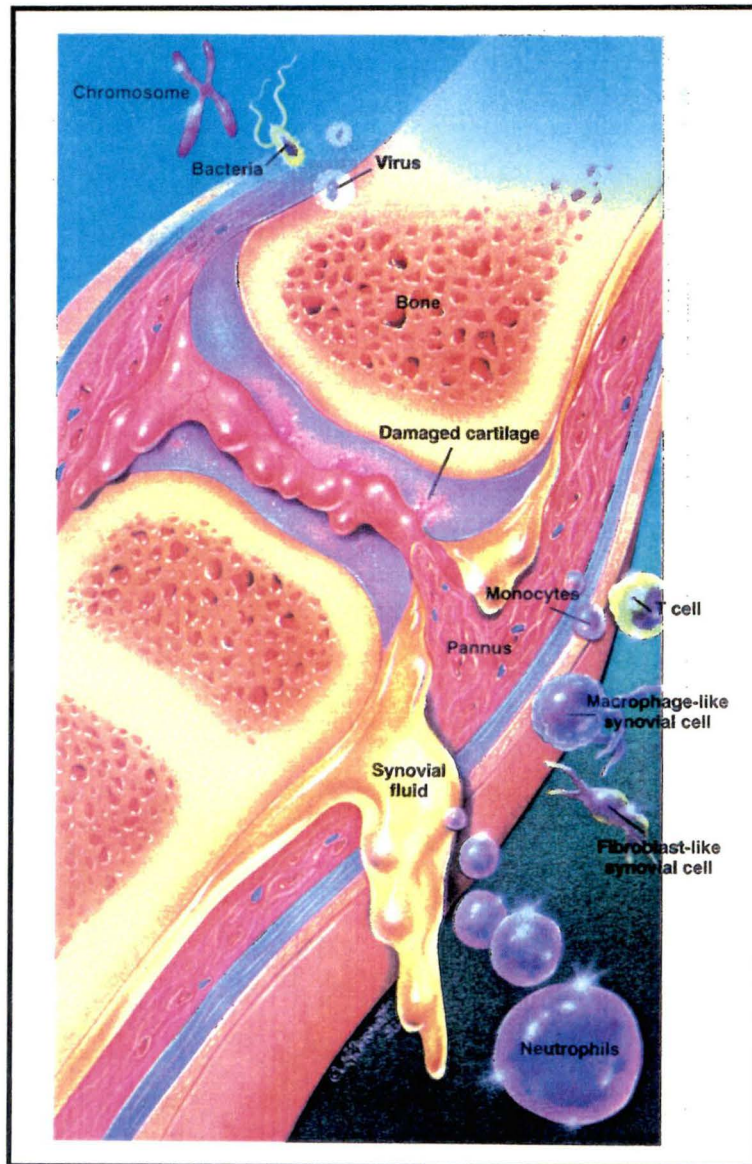


Figure 1: La synovite rhumatoïde. L'inflammation chronique de l'articulation se manifeste principalement chez des individus susceptibles du point de vue génétique, suite à un stimulus antigénique inconnu. La synovite rhumatoïde résulte d'une hyperplasie du tissu synovial, d'une migration de cellules inflammatoires, d'un dépôt de complexes immuns et de la libération d'enzymes protéolytiques. Ce processus inflammatoire invasif conduit à la destruction articulaire.

(Référence: Miller-Blair et Robbins, 1994. *Geriatrics* 48:28-38).

1.3.1 Susceptibilité génétique associée au MHC II

La prédisposition au développement de la PR semble être restreinte à certaines molécules du MHC de classe II. Cette prédisposition est associée au HLA-DR (DR4 et DR1) et plus particulièrement au niveau des résidus glutamine et lysine en position 70 et 71 de la chaîne β du HLA-DR (Williams WV et al., 1992; Winchester et al., 1992; Panayi, 1993; Winchester, 1994). Cette homologie de séquence de la région hypervariable du MHC II se retrouve chez plus de 90% des patients souffrant de PR. Toutefois, un faible pourcentage des individus qui portent ces haplotypes DR vont développer la maladie. Des observations analogues au niveau de la prédisposition génétique au développement de la maladie ont été obtenues dans le modèle expérimental d'arthrite à collagène (Breedveld et Trentham, 1987; Holmdahl et al., 1990). De façon intéressante, cette homologie de séquence se situe au centre de l'hélice α entourant le site de liaison antigénique du HLA-DR (Weyand et al., 1992). Par conséquent, la prédisposition au développement de la PR peut être associée à la présentation d'un peptide "X" toujours inconnu, dans un contexte trimoléculaire impliquant le peptide antigénique, le TCR et la molécule du MHC II (Figure 2).

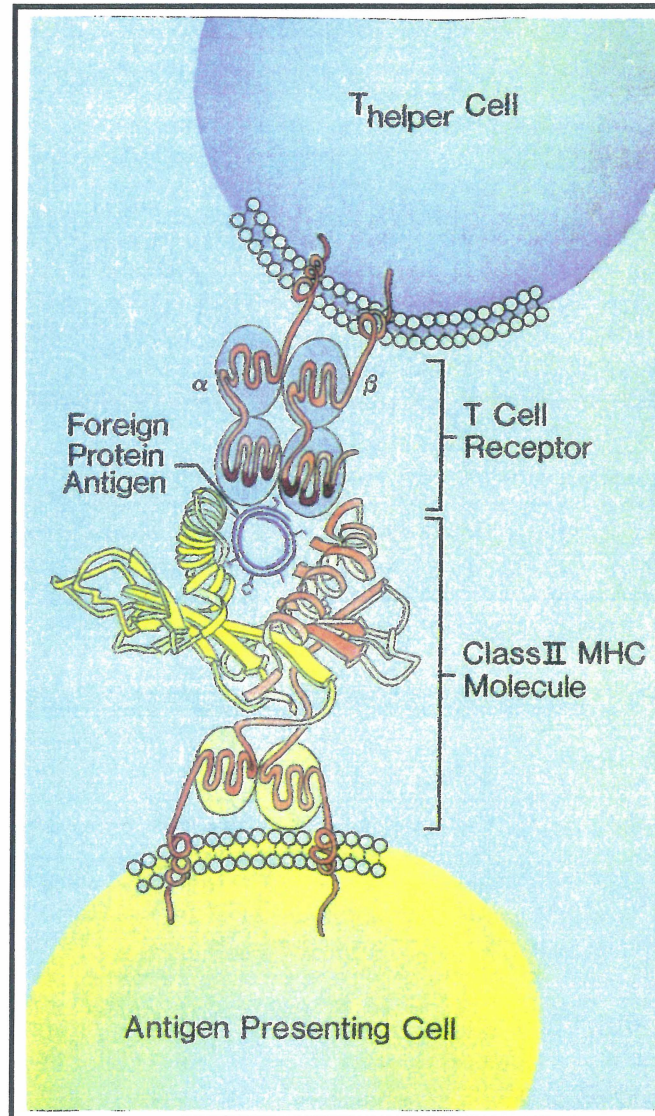


Figure 2: Représentation schématique du complexe trimoléculaire. La reconnaissance spécifique d'un déterminant antigénique présenté aux cellules T auxiliaires via le MHC de classe II. Cette reconnaissance s'effectue par l'interaction entre des molécules du MHC II, un peptide immunodominant et des molécules du TCR. Le complexe trimoléculaire peut être impliqué dans l'induction d'une réponse immune normale ou autoagressive.

(Référence: Shina et al., 1990. *Science* **248**:1380–1387).

1.3.2 Facteurs étiologiques proposés

En dépit de nombreuses recherches au niveau de l'induction possible de la PR, l'étiologie de la maladie est toujours obscure. Par contre, la susceptibilité génétique associée à certaines molécules du MHC II sous-entend l'implication de peptides spécifiques dans l'induction du processus inflammatoire. Des hypothèses actuelles suggèrent que des agents infectieux (bactéries, virus ou mycoplasmes) peuvent être engagés dans le développement de la PR (Silman, 1991; Inman, 1991; Zvaifler, 1993; Youinou et al., 1993; Keat, 1993).

Parmi les travaux les plus importants, certains appuient l'existence d'une infection par *Mycobactérium* dans l'initiation de la PR (Rook et al., 1990; Rook et Stanford, 1992; McCulloch et al., 1993; Rook et al., 1993; Gaston, 1993). La réponse immune semblerait principalement être dirigée contre la protéine de stress mycobactérienne de 65 kD (HSP65) (McLean et al., 1990; Karlsson-Parra et al., 1990). Les HSPs sont des protéines bien conservées à travers l'évolution: par exemple, la HSP65 possède 50% d'homologie de séquence avec la HSP60 humaine. D'une part les HSPs semblent présentes au niveau de la synoviale (Life et al., 1991), et d'autre part il existe une certaine réactivité croisée (homologie de séquence) entre les HSPs et les composantes du cartilage articulaire (van Eden et al., 1989; Danielli et al., 1992; Boog et al., 1992; Jones et al., 1993). Bien que la bactérie n'ait jamais été isolée de la synoviale rhumatoïde, ces observations appuient l'hypothèse de mimétisme moléculaire, entre l'agent exogène et l'hôte, dans l'initiation et/ou le maintien de la réponse autoagressive (Zwilling et Lipsky, 1987; Oldstone, 1987; Inman, 1991). Toutefois, il est peu probable que la PR soit spécifiquement causée par *Mycobactérium* et les HSPs puisque la réactivité anti-HSP est associée à plusieurs autres maladies autoimmunes (Kaufmann, 1994). De plus, cette réactivité est peu fréquente chez les patients atteints de PR. Enfin, l'implication possible des ces

bactéries dans la polyarthrite rhumatoïde semble tout à fait spéculatif et aucune étude supporte définitivement leur rôle dans l'initiation et le maintien de la maladie.

Un second agent infectieux proposé dans l'étiologie de la PR est le virus Epstein Barr (EBV), un virus lymphotrope (Fox et al., 1985; Inman, 1991). Trois types d'évidences appuient son implication possible. Premièrement, la présence de cellules B infectées par le virus chez certains patients rhumatoïdes (Tosato et al., 1981; Hasler et al., 1983; Kontinen et al., 1986). Toutefois, la présence du virus au niveau synovial n'a pas été démontrée (Brousset et al., 1993). Deuxièmement, les sérums de patients possèdent des anticorps dirigés contre certaines composantes protéiques du virus (Ferrell et al., 1981; Silverman et Schumacher, 1981). Troisièmement, des travaux axés sur le mimétisme moléculaire ont démontré un partage d'antigénicité entre des peptides d'EBV et les molécules HLA-DR (Roudier et al., 1989), le collagène type II (Vaughan, 1990) et les composantes articulaires (van Eden et al., 1989). Selon les observations obtenues jusqu'à présent, la détection du virus et des anticorps anti-EBV n'est pas évidente dans l'ensemble des patients rhumatoïdes. De plus, la signification entre l'immunorégulation altérée et l'infection par EBV dans la PR n'est pas définitivement prouvée. L'implication du virus peut toutefois définir un sous-groupe de manifestations immunologiques. Parmi d'autres virus potentiels, le parvovirus B19 humain a également été proposé comme agent causal dans la PR (White et al., 1985). Par contre, la plupart des travaux récents ne semblent pas associer la susceptibilité à la PR à une exposition au parvovirus B19 (Simpson et al., 1984; Taylor et al., 1992; Nikkari et al., 1994).

Les superantigènes sont une famille de protéines ayant des capacités immunomodulatrices puissantes. Les plus connues sont les toxines bactériennes, particulièrement les entérotoxines staphylococcales (Marrack et Kappler, 1990).

Elles activent des sous-populations de cellules T matures via certaines molécules V β du TCR, sans égard à la spécificité antigénique de ces cellules. Certains travaux appuient leur implication dans l'induction de maladies autoimmunes, telles que la PR, en activant des cellules autoréactives normalement tolérantes (Friedman et al., 1991; Lobo-Yeo et Lamb, 1993; Acha-Orbea, 1993; Goodacre et al., 1994). Parmi les populations de cellules T isolées de tissus synoviaux rhumatoïdes, les cellules T V β -17⁺ semblent être présentes de façon majoritaire (Howell et al., 1991; Bhardwaj et al., 1994). Par contre, des résultats contradictoires suggèrent la prépondérance de plusieurs autres V β différents (Uematsu et al., 1991; Paliard et al., 1991; Sottini et al., 1991). D'autre part, l'entérotoxine staphylococcale D induit sélectivement les cellules T CD4⁺ à stimuler les cellules B productrices d'autoanticorps (particulièrement le facteur rhumatoïde) chez les patients atteints de PR (He et al., 1992). L'implication des superantigènes dans le développement d'arthrites expérimentales a également été démontrée à l'aide de souris transgéniques ayant des cellules T avec un TCR V β -8⁺ (Mountz et al., 1994). Finalement, due à leur capacité d'activation sélective mais non spécifique des cellules T, le rôle des superantigènes dans le processus inflammatoire mérite d'être mieux défini.

De tous les candidats pathogènes proposés, seuls les HSPs mycobactériennes, l'EBV, le parvovirus B19 et les superantigènes ont fait l'objet de recherches intenses. Plusieurs évidences appuient un lien entre ces microorganismes et la PR, mais la plupart échouent dans la démonstration d'une preuve étiologique définitive.

1.3.3 Mécanismes de destruction de l'articulation

Bien que le dommage articulaire semble être une circonstance secondaire à l'initiation de la maladie, la destruction irréversible de l'articulation est la conséquence la plus sévère et la plus morbide de la PR. La synovite rhumatoïde

(pannus) se caractérise principalement par une hyperplasie du tissu synovial, associée à une infiltration de cellules inflammatoires comprenant surtout des macrophages, des fibroblastes, des mastocytes et des lymphocytes T et B. De plus, l'interaction entre ces différentes populations cellulaires conduit à la libération de plusieurs médiateurs inflammatoires qui semblent contribuer largement à la pathophysiologie de la PR.

L'inflammation synoviale et la formation de pannus sont sans doute des facteurs dominants dans la destruction articulaire chez les patients atteints de PR. Les enzymes protéolytiques produites et libérées de façon anormale dans l'articulation semblent avoir un rôle important dans la dégradation de la matrice articulaire et de l'os chez les rhumatoïdes (Vaes, 1981; Krane et Simon, 1986; Krane et al., 1990; Krane, 1993; Reife et al., 1993). Ces protéinases jusqu'à maintenant impliquées dans la dégradation des composantes articulaires sont subdivisées en trois grands groupes: les métalloprotéinases, les protéinases à sérine et les protéinases à cystéine (Nagase et Woessner, 1993). Les enzymes protéolytiques particulièrement étudiées dans l'érosion articulaire rhumatoïde incluent la collagénase (Evanson et al., 1967; Krane et al., 1990; McCachren et al., 1990), la stromélysine (Case et al., 1989; Walakovits et al., 1992), l'élastase (Gysen et al., 1985; Tanaka et al., 1990; Huet et al., 1992), les cathepsines B et L (Maciewicz et Etherington, 1988; Maciewicz et al., 1990; Nguyen et al., 1990; Tranbandt et al., 1991), de même que les calpaïnes tout récemment identifiées (Yamamoto et al., 1992).

Comme il le sera discuté plus loin, plusieurs médiateurs solubles ont été identifiés dans la synoviale rhumatoïde. Ces médiateurs inflammatoires semblent faciliter le processus de destruction articulaire (Reife et al., 1993; Pelletier et al., 1993). Particulièrement, l'IL-1 et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α),

synthétisées par les macrophages activés du pannus, sont impliquées dans la synthèse et la libération d'enzymes protéolytiques par les différentes populations cellulaires synoviales (Dayer et al., 1985, 1986; Frish et Ruley, 1987; Huet et al., 1993). Finalement, le rôle des prostaglandines et des leucotriènes semble important dans le dommage articulaire, mais ils sont encore très peu connus (Robinson et al., 1975; Sano et al., 1992; Pelletier et al., 1993; Koopman et Gay, 1993).

1.3.4 Cytokines

Plusieurs types cellulaires agissent comme cellules présentatrices d'antigènes (APC), particulièrement les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B. La présentation de peptides "X" dans un contexte trimoléculaire initie l'activation de signaux intracellulaires menant à la production de cytokines. L'articulation des patients atteints de PR est exposée à un environnement de plusieurs cytokines qui semblent jouer un rôle majeur dans la pathogénèse de la maladie. Chez les rhumatoïdes, les cellules T activées expriment des récepteurs de l'interleukine (IL)-2 et produisent de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'interféron gamma (INF γ) (Hooks et al., 1979; Degre et al., 1983; Schattner, 1994). Des concentrations importantes d'IL-1, de TNF- α , de "granulocyte/macrophage-colony stimulating factor" (GM-CSF), d'IL-10 et d'IL-6 produits par les APC sont détectées chez les patients rhumatoïdes (Eastgate et al., 1988; Saxne et al., 1988; Lipsky et al., 1989; Dong et al., 1989; Alvaro-Gracia et al., 1989; Manicourt et al., 1993; Katsikis et al., 1994). Par conséquent, une variété de cellules effectrices, incluant cellules T et B, macrophages, fibroblastes, synoviocytes et chondrocytes, peuvent être activées et peuvent produire des médiateurs inflammatoires de même que des enzymes protéolytiques conduisant à la destruction de l'articulation (Lipsky et al., 1989; Arend et Dayer, 1990; Fong et al., 1994). De plus, l'IL-1 et le TNF- α semblent jouer un rôle majeur dans l'activation des cellules B afin de permettre la production

d'autoanticorps (Kollias, 1993; Schattner, 1994; Cavallo et al., 1994). Des recherches récentes, centrés sur des études *in vitro*, sur des modèles d'arthrite induite et sur des données cliniques, ont suggéré que le TNF- α semble être un médiateur inflammatoire ayant un rôle critique dans la PR (Chu et al., 1991; Brennan et al., 1992; Kollias, 1993; Cope et al., 1994).

1.3.5 Autoimmunité médiée via les cellules T

Plusieurs évidences laissent supposer un rôle majeur des cellules T dans le processus inflammatoire et dans la destruction progressive de l'articulation chez les patients souffrant de PR (Alpert et al., 1987; Firestein et al., 1987; McDermott et McDevitt, 1988; van Eden et de Vries, 1989; Sewell et Trentham, 1993). Entre autres, le marqueur CD4 constitue le phénotype dominant des cellules T présentes dans le pannus de patients rhumatoïdes (Van Boxel et Paget, 1975; Panayi, 1993); les cellules T expriment plusieurs marqueurs d'activation (Panayi et al., 1992), dont le récepteur hétérodimérique $\alpha\beta$ de l'IL-2 (IL-2R) (Pitzalis et al., 1987; Luqmani et al., 1994); et l'amélioration des manifestations de la maladie à l'aide de traitements éliminant les cellules T, tels que le drainage du canal thoracique, l'irradiation, le traitement par la cyclosporine, par des anticorps anti-TNF- α ou par des anticorps anti-CD4 (Paulus et al., 1977; Trentham et al., 1981; van Rijthoven et al., 1986; Van der Lubbe et al., 1994; Gaur et Fathman, 1994; Williams RO et al., 1994). Des études récentes ont démontré que l'immunothérapie à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le TNF- α chez des modèles expérimentaux (Williams RO et al., 1992) de même que chez des patients atteints de PR (Elliott et Maini, 1993; Elliott et al., 1993, 1994a et b; Campion, 1994), semble être une voie de traitement prometteuse.

L'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales de la synoviale semblent également jouer un rôle important dans l'attraction des leucocytes au niveau du tissu synovial (Haynes et al., 1989; Koopman et Gay, 1993). La molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) est surexprimée à la surface des cellules endothéliales synoviales rhumatoïdes. Cette expression est augmentée par plusieurs cytokines, incluant l'IL-1, le TNF- α et l'INF- γ (Kavanaugh et al., 1991; Oppenheimer-Marks et al., 1991; Abbott et al., 1992). L'attraction de cellules T dans la synoviale rhumatoïde semble s'effectuer selon un processus spécifique. Les cellules T CD4⁺ infiltrant la synoviale rhumatoïde sont non seulement majoritaires, elles expriment aussi les antigènes CD29/CD45RO associés aux cellules à mémoire (Pitzalis et al., 1988; Kingsley et al., 1988; Cush et Lipsky, 1991). De plus, les cellules T CD8⁺CD45RA⁺ suppressives/effectrices sont proportionnellement diminuées, tandis que les cellules T CD8⁺CD29⁺S6F1⁺ tueuses/effectrices sont proportionnellement augmentées au niveau synovial (Duke et al., 1982; Alpert et al., 1987; Nakao et al., 1990; Sohen et al., 1991). Dans l'ensemble, ces observations appuient, (1) l'activation, la différenciation et la prolifération des cellules T in situ; (2) la sécrétion de médiateurs inflammatoires; et (3) la différenciation des cellules B conduisant à la production d'autoanticorps. Ces facteurs sont nécessairement impliqués dans l'inflammation de la synoviale chez les patients rhumatoïdes.

L'analyse des gènes de la région variable V du TCR (α/β ou γ/δ) permet d'obtenir certaines informations utiles concernant la réponse cellulaire T au niveau de la synoviale de patients atteints de PR. Plusieurs études ont analysé la région variable de la chaîne β du TCR des cellules T afin de déterminer la présence de clones de cellules CD4⁺ effectrices chez ces patients. Certaines études suggèrent l'utilisation restreinte de V β du TCR au niveau synovial (Williams WV et al., 1992; Weyand et al., 1992; Salmon, 1992); toutefois, aucune confirmation évidente ne suggère la

présence d'une population oligoclonale (Moss et al., 1992; Koopman et Gay, 1993; Amento, 1993). Cette polyclonalité peut être associée à: (1) une réponse spécifique des cellules T contre plusieurs déterminants antigéniques d'une même molécule ou contre plusieurs peptides différents, dont la spécificité est toujours inconnue; (2) une stimulation via les superantigènes; (3) l'hétérogénéité de la réponse des patients rhumatoïdes; et (4) la présentation de peptides par des molécules HLA-DR différentes.

D'autres études, centrées sur les gènes de la région V δ du TCR des cellules T, ont démontré une augmentation proportionnelle du taux de cellules T γ/δ avec une utilisation restreinte de V δ chez les patients rhumatoïdes (Sioud et al., 1990; Smith et al., 1990; Kjeldsen-Kragh et al., 1990; Keystone et al., 1991; Olive et al., 1992, 1994). La majeure partie des données fournies par ces études ont démontré que les cellules T γ/δ de la synoviale sont activées spécifiquement par des antigènes bactériens, tels que *Mycobacterium tuberculosis* et les HSPs mycobactériennes (Janis et al., 1989; O'Brien et al., 1989; Söderström et al., 1990; Holoshitz et al., 1992). Ces observations suggèrent que les cellules T γ/δ ont un rôle dans l'initiation d'une réponse immune contre certains microorganismes, superantigènes et/ou contre des peptides impliqués dans le mimétisme moléculaire (Winfield et Jarjour, 1991).

1.3.6 Autoimmunité médiée via les cellules B et autoanticorps

Dans la PR, la présence d'un grand nombre de cellules T CD4⁺ à mémoire (CD45RO⁺) suggère fortement l'existence d'une exposition et d'une stimulation antigénique préalable. Cette sous-population de cellules T favorise d'une part la libération de cytokines, telles que l'IL-6, stimulant les cellules B autoréactives à produire des autoanticorps, et d'autre part en n'exerçant aucune régulation négative sur la synthèse de ces immunoglobulines. Toutefois, l'hypothèse d'une stimulation

antigénique spécifique est encore à l'état d'exploration et la possibilité d'une activation polyclonale de clones de cellules B n'est pas exclues. D'une façon générale, la PR se caractérise par la présence de cellules B autoréactives activées et différenciées en plasmocytes, de même que par la formation de complexes immuns circulants pouvant se déposer au niveau de l'articulation (Harris, 1990; Zvaifler, 1993). Le facteur rhumatoïde (FR), décrit il y a plus de 50 ans déjà (Waalder, 1940; Rose et al., 1949), est le système autoimmunitaire le mieux connu dans la PR (Schrohenloher et Koopman, 1993). Ce sont des autoanticorps d'isotype IgM surtout, synthétisés et sécrétés par des lymphocytes B CD5⁺, et dirigés contre des déterminants antigéniques de la portion Fc des IgG (Maini et Zyberk, 1988; Moore et Dorner, 1993). Certaines études suggèrent que le FR semble jouer un rôle majeur dans la pathogénèse de la PR via la formation locale de complexes immuns, conduisant à l'activation du complément, l'inflammation chronique et la destruction de l'articulation (Harris, 1990; Moore et Dorner, 1993). Le FR est jusqu'à maintenant utilisé comme marqueur diagnostique de la maladie, en subdivisant les patients en deux groupes: les PR séropositives et séronégatives (Masi et Feigenbaum, 1983; Schrohenloher et Koopman, 1993; Aho et Kurki, 1994). Malgré sa fréquence d'environ 70% chez les rhumatoïdes, le FR est souvent absent à des stades précoces de la maladie et souvent détecté à de hauts titres dans des maladies inflammatoires autres que la PR, telles que le LED, et dans des maladies infectieuses diverses de même que chez des individus normaux (Schrohenloher et Koopman, 1993).

Une variété d'autoanticorps autres que le FR ont été décrits chez les patients atteints de PR (Baum et al., 1993). Certaines études ont analysé la présence d'anticorps antinucléaires (ANA) chez les rhumatoïdes. Les patients ANA positifs semblent être atteints de PR plus sévère avec un FR le plus souvent positif et avec la présence de

vasculites (Pitheathly et Taylor, 1967; Aitchison et al., 1980; Smolen et al., 1990b). Les ANA sont toutefois présents dans plusieurs autres maladies du tissu conjonctif et aucun sous-groupe d'ANA n'est caractéristique de la PR (Nakamura et Tan, 1992). Des travaux centrés sur l'association clinique des anticorps anti-SS-A/Ro, détectés principalement chez les patients lupiques et atteints du SS, suggèrent que ces autoanticorps peuvent être utilisés d'une part comme marqueurs d'un sous-groupe de PR plus sévère (Boire et Ménard, 1988) et d'autre part comme marqueurs pronostiques de PR non-HLA-DR4⁺ (Boire et al., 1993).

Des anticorps dirigés contre des protéines associées aux filaments intermédiaires sont détectés dans les sérums rhumatoïdes. Le facteur antipérinucléaire (FAP) identifié en immunofluorescence indirecte à l'aide de sérums de PR, détecte des granules kérato-hyalins autour du noyau de cellules épithéliales de la muqueuse buccale humaine (Nienhuis et Mandema, 1964; Westgeest AAA et al., 1987; Vivino et Maul, 1990; Hoet et al., 1991). En dépit d'une sensibilité et d'une spécificité satisfaisantes (~75% et ~90%, respectivement) il est difficile d'obtenir un substrat approprié et reproductible (Youinou et al., 1992). L'anticorps anti-kératine (AKA), identifié aussi en IFI sur des coupes d'oesophage de rat et d'épiderme humain, est un autre marqueur associé à la PR (Young et al., 1979; Ordeig et Guardi, 1984; Kirstein et Matthiesen, 1987; Vincent et al., 1989). Bien que la sensibilité des AKA soit plus faible que le FAP, les deux systèmes semblent être liés du point de vue reconnaissance antigénique (Johnson et al., 1981; Hoet et al., 1991; Aho et al., 1993). Des travaux récents ont démontré que la filaggrine, une protéine associée aux filaments intermédiaires, est identifiée spécifiquement par les sérums AKA positifs (Simon et al., 1993). Parmi les anticorps dirigés contre les filaments intermédiaires, les anti-vimentine sont aussi détectés dans les sérums de diverses maladies

rhumatismales incluant la PR (Alcover et al., 1984; Fabregas–Canales et al., 1989; Sánchez et al., 1990; Nagle, 1994).

Tel qu'introduit ci-haut, les patients rhumatoïdes ont une réponse immune contre des agents exogènes. Les sérums de PR possèdent fréquemment des anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires ("RA-associated nuclear antigens": RANA) codés par le virus EBV (Alspeugh et Tan, 1975; Catalano et al., 1979; Ng et al., 1980). Les déterminants antigéniques majeurs identifiés par ces sérums anti-RANA positifs sont les antigènes nucléaires-1 et -2 codés par le virus (ANEB-1 et -2) (Billings et al., 1983). L'incidence des anticorps dirigés contre ANEB-2 (~90 kD) est plus grande chez les patients rhumatoïdes (Sculley et al., 1986b; Hazelton et al., 1987). Toutefois, ces anticorps semblent peu spécifiques pour la PR (Sculley et al., 1986a) et peu de travaux sont effectués à l'heure actuelle. Les HSPs ont également été proposés dans la réponse humorale de PR et dans l'arthrite à adjuvant chez le rat (McLean et al., 1991). Les anticorps sont principalement dirigés contre la HSP humaine de 60 kD et contre son homologue mycobactérien de 65 kD (Kaufmann SHE, 1994). Malgré la possibilité d'une réponse contre des protéines de stress endogènes éventuellement induite via l'inflammation, la détection d'anticorps anti-HSP ne se restreint pas à la PR mais plutôt à l'ensemble des désordres autoimmuns (Winfield et Jarjour, 1991; Danieli et al., 1992a et b; Rambukkana et al., 1993; Yokota et al., 1993).

Les anticorps dirigés contre les composantes articulaires, principalement le collagène, suscitent beaucoup d'intérêt dans l'étude de la réponse autoimmune rhumatoïde. Cet intérêt est basé sur deux observations importantes: la démonstration d'une arthrite induite chez les rongeurs suite à l'immunisation avec le collagène type II (Trentham et al., 1977; Courtenay et al., 1980; Holmdahl et al., 1986; Larsson et

al., 1990); et la présence d'autoanticorps anti-collagène II (formes native et dénaturée) dans les sérums et liquides synoviaux de PR (Morgan et al., 1987; Tarkowski et al., 1989; Cook et al., 1994). La formation locale de complexes immuns suggère un rôle possible des anticorps anti-collagène II dans la pathogénèse de la maladie (Rönnelid et al., 1994). Toutefois, l'incidence de ces anticorps dans la PR est assez faible (10–20%) et leur détection dans plusieurs autres maladies rhumatismales suggère une faible spécificité pour la PR (Choi et al., 1990; Morgan, 1990). Des anticorps dirigés contre d'autres composantes articulaires ont été rapportés. Entre autres, des anticorps anti-protéine de liaison au cartilage ("link protein") détectés dans les sérums de PR de même que d'arthrites non inflammatoires (Austin et al., 1988); et des anticorps dirigés contre les protéoglycans de l'articulation (Glant et al., 1990). Enfin, ces réponses autoimmunes humorales contre des protéines de l'articulation sont probablement des épiphénomènes dus au dommage tissulaire et à l'exposition de déterminants immunogéniques.

Finalement, de nouveaux systèmes antigène-anticorps associés à la PR ont été récemment décrits: les anticorps anti-HaT-1 (Abe et al., 1988) et les anticorps anti-RA33 (Hassfeld et al., 1989, 1993; Smolen et al., 1990a). L'autoantigène HaT-1 (~150 kD) a été identifié en immunodiffusion à l'aide d'extraits bruts de foie humain et de rat. Malgré sa spécificité intéressante pour la PR, la caractérisation ultérieure du système HaT-1 n'a pas été approfondie. D'autre part, l'antigène RA33 (pour 33 kD) isolé et purifié à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa, possède une homologie de séquence peptidique avec la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène A2 (A2-hnRNP) s'associant aux acides nucléiques (Steiner et al., 1992). Malgré sa spécificité considérable pour la PR initialement (avec une incidence de 36%), le système RA33/A2hnRNP est aujourd'hui associé à d'autres maladies rhumatismales telles que le LED (Isenberg et al., 1994).

1.4 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

La caractérisation antérieure de la PR permet définitivement de considérer la maladie comme un désordre autoimmun non spécifique d'organe. Cette classification arbitraire regroupe pratiquement l'ensemble des maladies rhumatismales parmi les désordres autoimmuns systémiques. À l'exception de la PR, les maladies rhumatismales inflammatoires sont caractérisées par la présence d'anticorps ou de sous-groupes d'anticorps spécifiques. Par exemple, les patients atteints du LED possèdent couramment des anticorps anti-ADN et anti-Sm. Les patients atteints de sclérodermie ont des anticorps anti-Scl-70 et anti-centromère. Les patients souffrants de polymyosite ont des anticorps anti-Jo1 et anti-ARNt synthétases et les patients atteints du syndrome de Sjögren possèdent des anticorps anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La). L'identification de marqueurs spécifiques est donc très utile au niveau du diagnostic et du pronostic d'une maladie, de même que pour connaître les facteurs physiopathologiques impliqués dans le processus autoimmun.

Bien que de nombreux marqueurs aient été identifiés dans les sérums de PR, aucun système antigène-anticorps bien défini et spécifique existe à l'heure actuelle. Malgré sa faible spécificité, le FR reste toujours le meilleur outil sérologique pour la maladie. La production locale du FR, de même que son dépôt au niveau de l'articulation suggère toutefois un rôle possible de l'autoanticorps dans la pathogénèse de la maladie. Le but de ce travail consiste donc à identifier de nouveaux systèmes autoimmuns potentiels pouvant servir de marqueurs spécifiques pour la PR, voire même impliqués directement ou indirectement dans le développement de la maladie.

Cette étude présente trois nouveaux systèmes autoimmuns associés à la PR: deux spécifiques (antigène Sa et calpastatine) et un non spécifique (protéine disulfure isomérase: PDI). L'identification de ces systèmes antigène-anticorps a été effectuée d'une part avec des extraits tissulaires humains et d'autre part en utilisant une bibliothèque d'expression d'ADNc de placenta humain. Premièrement, le système Sa (détecté pour la première fois à l'aide du sérum d'une patiente nommée Savoie) a été identifié en utilisant des extraits de rate et de placenta humains. Les résultats suggèrent que les autoanticorps anti-Sa sont spécifiques et sont détectés avec une incidence importante (42.7%) dans les sérums de patients rhumatoïdes. La présence des anticorps anti-Sa est indépendante du FR, puisqu'ils sont détectés tant dans les sérums FR positifs que négatifs. De plus, les anticorps anti-Sa sont souvent présents au tout début des manifestations rhumatoïdes et semblent varier dans certains cas avec l'activité de la maladie. De façon intéressante, l'autoantigène Sa est présent au niveau du tissu cible (membrane synoviale), et les autoanticorps anti-Sa sont détectés au niveau local (liquide synovial). Des analyses immunochimiques comparatives démontrent que l'antigène Sa est unique et n'a aucune relation avec les systèmes immuns antérieurement décrits dans la PR. Le système Sa/anti-Sa semble donc être un marqueur diagnostique prometteur pour la PR et pourra servir de modèle d'étude dans la caractérisation de la maladie.

À la suite de la purification et du microséquençage de l'antigène Sa placentaire, une des trois bandes polypeptidiques s'est révélée homologue avec la protéine disulfure isomérase (PDI). La PDI est un polypeptide multifonctionnel impliqué dans l'hydroxylation co- et post-transcriptionnelle des résidus proline du pro-collagène en collagène (Kivirikko et al., 1989). L'ADNc de la PDI a été isolé par réaction en chaîne de polymérase et sous-cloné dans le vecteur d'expression pGEX-KG afin d'exprimer et de purifier la protéine recombinante (PDIr). Les sérums de patients

atteints de PR et d'autres maladies non-rhumatoïdes ont détectés la PDIr en immunobuvardage. Des expériences d'absorptions entre l'antigène Sa et la PDIr suggèrent que les deux protéines sont distinctes. Cette réponse autoimmune non spécifique dirigée contre la PDI mérite toutefois d'être caractérisée plus en profondeur.

Le criblage de bibliothèques d'expression et l'isolement de clones d'ADNc codant pour des protéines autoantigéniques ont été fréquemment utilisés dans le passé afin d'identifier de nouveaux systèmes autoimmuns (Saitta et Keen, 1992). La seconde portion de ce travail consistait à cribler une bibliothèque d'expression d'ADNc de placenta humain, à l'aide d'un pool de sérums de patients atteints de PR érosive. Un clone d'ADNc (RA-1) a été identifié et code pour un polypeptide de 284 acides aminés correspondant à deux des quatre domaines inhibiteurs de la calpastatine. De façon intéressante, la calpastatine est l'inhibiteur naturel des calpaïnes, des protéinases à cystéine dépendantes du calcium agissant comme activateurs intracellulaires au niveau de la transduction de signal (Croall et Demartino, 1991; Mellgren, 1987; Suzuki et al., 1991). De plus, les calpaïnes ont un rôle dans la destruction des composantes articulaires chez les patients rhumatoïdes (Yamamoto et al., 1992). Le clone RA-1 a par la suite été exprimé à l'aide d'un système d'expression procaryotique et la protéine recombinante a été purifiée par affinité. À l'analyse en immunobuvardage, une proportion significative (45.7%) des sérums de PR possède des autoanticorps dirigés contre la protéine recombinante. Ces résultats montrent que la calpastatine est un nouvel autoantigène associé à la PR. L'identification de ce nouveau système permet de soulever l'hypothèse d'un rôle pathogénique de ces autoanticorps en bloquant la capacité inhibitrice de la calpastatine sur les protéinases.

Finalelement, des résultats préliminaires obtenus au niveau de la réactivité croisée entre les systèmes Sa et calpastatine suggèrent la possibilité d'un partage antigénique entre ces deux autoantigènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 SÉRUMS ET ANTICORPS UTILISÉS

L'étude présentée ici a été effectuée avec un grand nombre de sérums de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et de témoins. Les sérums témoins proviennent de patients non rhumatoïdes, ainsi que d'individus normaux. Des échantillons sériques provenant de divers patients, d'individus normaux et d'animaux immunisés ont également été utilisés comme sérums de référence (témoins positifs ou négatifs) tout au long de cette recherche. Ces sérums ont été analysés principalement à l'intérieur de deux séries d'expériences de détection d'autoanticorps associés à la PR: 1) le système Sa/anti-Sa et 2) les autoanticorps anti-calpastatine.

2.2 SYSTÈME Sa/ANTI-Sa

2.2.1 Patients et témoins utilisés pour la signification clinique des autoanticorps anti-Sa. Cette étude comporte des échantillons sériques de 482 patients. Deux cent six de ces patients ont satisfait aux critères cliniques de l'*American College of Rheumatology (ACR)* (Arnett et al., 1987) pour le diagnostic de la PR. Ces patients ont été suivis au service de rhumatologie de la faculté de médecine de Sherbrooke et ont accepté de participer à l'étude de dépistage des autoanticorps associés à la PR. De ce groupe de rhumatoïdes au nombre de 206, 7 patients possédaient aussi les critères du LED et 1 patient, ayant des anticorps anti-Scl-70, pouvait être classifié comme atteint de sclérodémie systémique (ScS). Ces 8 patients ont donc été considérés être atteints de 2 maladies concomitantes, PR-LED ou PR-ScS respectivement. Le premier groupe de patients témoins était composé de 188 individus souffrant de diverses maladies rhumatismales inflammatoires: 68 patients lupiques (LED), 24 atteints de ScS, 16 atteints du syndrome de Sjögren (SS), 8 atteints de collagénoses mixtes (MCTD) (tous positifs pour les anticorps anti-U1 RNP), 5 atteints de polydermatomyosite (PM/DM), 5 atteints de LE discoïde, 36 patients souffrant de collagénose non différenciée (UCTD), 24 patients atteints de

spondyloarthropathies (14 atteints d'arthrite psoriasique et 10 atteints de Reiter/arthrite réactive), 1 patient atteint de la maladie de Still, et 1 patient atteint de polymyalgia rheumatica. Le second groupe de témoins incluait 88 patients souffrant de maladies non inflammatoires dont 42 individus âgés atteints d'arthrose (OA), 36 individus normaux et 10 jeunes patients atteints de mononucléose infectieuse (MI). Pour ces 10 derniers patients, la détection des anticorps dirigés contre les Antigènes Nucléaires du Virus Epstein-Barr (EBNA-1 et -2) et contre l'Antigène de la Capside du Virus Epstein-Barr (ACV-EB) fut confirmée par la méthode d'immunofluorescence anti-complément (IFAC) et d'immunofluorescence indirecte (IFI), respectivement (Organon Teknika, Scarborough, ON, Canada). Après coagulation, les sérums ont été séparés par centrifugation (1500 rpm/15 minutes), aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.2.2 Détection des autoanticorps anti-Sa dans le liquide synovial. Dans le but de comparer la présence d'autoanticorps anti-Sa au niveau sérique et synovial, des liquides synoviaux provenant de 18 patients rhumatoïdes et de témoins ont été obtenus lors de ponctions articulaires diverses.

2.2.3 Sérums et anticorps de référence utilisés dans la caractérisation du système Sa/anti-Sa. Les sérums de référence positifs contre les autoantigènes Ro (SS-A), La (SS-B), U1 RNP, Sm, Jo-1, et Scl-70 ont été obtenus du "Centers for Disease Control" (Atlanta, GA, USA). Les sérums de référence anti-Sa positifs ont été identifiés selon leur degré de réactivité par la technique d'immunobuvardage, de même que par leur absence de réactivité avec d'autres autoantigènes communs. Les anticorps de référence dirigés contre le facteur antipérinucléaire (FAP) ont été fournis par le Dr. A.A.A. Westgeest (Westgeest et al., 1989) du "Netherlands Red Cross Central Laboratory" (Amsterdam, Netherlands). Les sérums anti-A2 hnRNP

(RA33) positifs ou négatifs ont été fournis par le Dr. J. Smolen (Hassfeld et al., 1989) du "Lainz Hospital" (Vienne, Autriche). De façon réciproque, 10 sérums rhumatoïdes anti-Sa positifs et négatifs ont été envoyés au laboratoire du Dr. J. Smolen afin d'analyser leur réactivité contre l'autoantigène hnRNP A2 (RA33). Les sérums FAP et anti-filaggrine positifs ou négatifs provenant de 73 patients rhumatoïdes ont été fournis à l'intérieur d'une étude de collaboration par le Dr. J.M. Berthelot du centre hospitalier universitaire de Nantes, France (Simon et al., 1993). Inversement, 50 sérums de patients souffrant de diverses maladies rhumatismales ont été envoyés au laboratoire du Dr. J.M. Berthelot afin d'analyser en IFI la présence d'anticorps anti-filaggrine (anti-"kératine") sur oesophage de rat et du facteur antipérinucléaire sur cellules de la muqueuse buccale humaine. Ces 50 échantillons provenaient de 15 PR anti-Sa fortement positifs, 16 PR anti-Sa négatifs, 10 patients lupiques et 9 patients atteints d'arthrose.

Plusieurs autres anticorps de référence ont été utilisés afin de vérifier l'association possible du Sa avec des antigènes potentiels. Un antisérum polyclonal de lapin (P1-3) dirigé contre la protéine de stress humaine de 60 kD (HSP 60 kD) a été fourni par le Dr. R.S. Gupta, McMaster University. De plus, des anticorps monoclonaux (mAb) de souris dirigés contre diverses protéines de stress mycobactériennes (*M. leprae* ou *M. tuberculosis*), HSP 70-71 kD, 65 kD et 16-18 kD, ont été fournis par le Dr. M. Shinnick du "UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases-Centers for Disease Control" (Atlanta, GA, USA). Un antisérum de lapin dirigé contre le collagène articulaire a été obtenu du Dr. A.R. Poole, McGill University. Des anticorps polyclonaux de chèvre et monoclonaux de souris dirigés contre la vimentine (Sigma, St-Louis, MO, USA) ont également été utilisés comme anticorps de référence.

2.3 AUTOANTICORPS ANTI-CALPASTATINE

2.3.1 Sérums et anticorps utilisés pour le clonage et la caractérisation du système calpastatine/anti-calpastatine. Cette étude comporte au total 97 échantillons sériques de patients et de témoins. Quarante-quatre (44) sérums rhumatoïdes proviennent de patients ayant satisfait aux critères de l'ACR pour le diagnostic de la PR (Arnett et al., 1987). Les 53 sérums témoins utilisés proviennent de 11 patients atteints de LED, 27 patients souffrant d'arthrose, 5 patients atteints de maladies rhumatismales diverses et de 10 individus normaux. Les sérums obtenus ont été aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Un pool de trois sérums rhumatoïdes a été utilisé pour le criblage de la bibliothèque d'expression d'ADNc de placenta humain (λ gt11). Ces trois sérums sélectionnés sont positifs pour les autoanticorps associés à la PR (FR, FAP et anti-Sa) et négatifs pour les systèmes autoimmuns communs détectés dans certaines maladies rhumatismales (Ro/SS-A, U1RNP, A2 hnRNP/RA33, histones et vimentine). Afin d'éliminer la réactivité des anticorps contre les protéines bactériennes, le pool de sérums a été préalablement absorbé avec un lysat total de la lignée *Escherichia coli* Y1090 et conservé à 4°C avec 0.05% final de NaN_3 jusqu'au moment de l'utilisation.

Un sérum polyclonal de chèvre dirigé contre la glutathion S-transférase (GST) a été utilisé afin d'analyser l'expression et la purification de protéines de fusion induites dans le système d'expression procaryotique pGEX (Pharmacia, Uppsala, Suède).

2.4 SÉROLOGIE AUTOIMMUNE

Les méthodes utilisées pour détecter certains des autoanticorps communs associés aux maladies rhumatismales ont toutes été mises au point dans notre laboratoire (Boire et al., 1991). Brièvement, la détection et la titration du FR sont effectuées par un test d'agglutination à l'aide d'IgGs de lapin liées de façon covalente à des billes de

latex. Le facteur antinucléaire (FANA) est identifié par immunofluorescence indirecte (IFI), en utilisant la lignée hépatocytaire HEp-2 comme substrat. Les anticorps dirigés contre l'ADN double brin (ADNdb) sont identifiés par radioimmunoessai (RIA) avec l'ADN du phage lambda radiomarké au tritium (^3H -ADN) et par méthode immunoenzymatique (ELISA) commerciale (IAF Biochem, Montréal, QC). Enfin, un système d'immunodiffusion (ID) en gel d'agarose, avec des extraits salins de thymus de lapin et de rate humaine comme antigène, a été utilisé pour détecter les autoanticorps suivants: anti-Sm, anti-U1RNP, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anti-Jo-1, anti-PM/Scl et anti-Scl-70.

2.5 PRÉPARATION DES SOURCES ANTIGÉNIQUES

2.5.1 Extraits de tissus humains. Des extraits de rate (ERH), de placenta (EPH) et de synoviale (ESH) humaines ont été préparés à partir d'organes ou de tissus frais, congelés rapidement sous azote liquide et conservés à -80°C (Clark et al., 1969; Boire et al., 1991; Després et al., 1994). Les rates normales ont été prélevées à l'autopsie et les placentas frais ont été obtenus immédiatement après l'accouchement. Les tissus synoviaux ont été obtenus lors de remplacements d'articulation chez des patients rhumatoïdes (Drs. R. Dumais et A. Dumont, Département d'orthopédie, CHUS). Toutes les procédures ont été effectuées à 4°C et les tampons ont été supplémentés avec 0.02% NaN_3 , 1.5 mM dithiothreitol (dt), 1 mM phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF) et 5 $\mu\text{g/ml}$ chacun de chemostatin, leupeptin, antipain et pepstatin (CLAP) (Sigma, St-Louis, MO, USA). Brièvement, le tissu (coupé en morceaux d'environ 2 mm^2) est homogénéisé pendant 10-15 minutes dans 4 volumes de tampon d'homogénéisation contenant 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl (TBS-120 mM NaCl). L'homogénat est ensuite centrifugé à 16000 xg pendant 60 minutes à 4°C (Sorval RC2-B). Le surnageant recueilli est ajouté au diéthylaminoéthyl cellulose (résine d'échange d'anions-DE52, Whatman, Kent,

Angleterre) pré-équilibré avec le tampon d'homogénéisation, à raison de 1 g de résine/g de tissu. Après une heure d'incubation, les protéines liées à la résine sont éluées séquentiellement avec un tampon TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) contenant 150, 200, 250 et 300 mM NaCl. L'élution des fractions s'est effectuée sur Buchner en utilisant un papier filtre de type Reeve angle 202 (Whatman, Kent, Angleterre). Les fractions semi-purifiées sont soit conservées à -80°C pour purification ultérieure par HPLC (décrit ci-dessous), soit dialysées contre trois changements de 100 volumes d' H_2O bidistillée contenant 0.15 mM PMSF pendant 24 heures à 4°C . Les fractions dialysées sont ensuite congelées sous azote liquide, puis finalement lyophilisées et conservées à -20°C pour être ensuite utilisées lors de criblage de sérums de patients en immunobuvardage.

2.5.2 Composantes articulaires. Des extraits purifiés de collagènes et de protéines de la matrice articulaire humaine et canine ont été généreusement fournis par le Dr. M. Adams de l'Université de Calgary (Adams et al., 1986). Les échantillons humains proviennent de différentes articulations d'individus normaux, tandis que les échantillons canins ont été prélevés et combinés à partir de genoux et d'épaules de chiens normaux.

2.5.3 Cellules et lignées cellulaires. Les lignées cellulaires humaines HeLa (épithélioïdes) et MOLT-4 (lymphôme de cellules T) et animales Pt K2 (cellules épithéliales de rein) et 3T3 (cellules fibroblastiques), proviennent de "American Type Tissue Culture Collection" (ATCC; Rockville, MD, USA). Ces cellules ont été maintenues en culture à 37°C avec 5% de CO_2 dans le milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal, 60 $\mu\text{g/ml}$ de pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine (Sigma, St-Louis, MO, USA). Des extraits totaux de l'ensemble des cellules ont été obtenus par sonication dans un tampon NET-2 (50 mM Tris-HCl,

pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40), suivi d'une centrifugation à 13000 xg pendant 15 minutes. Les fractions solubles (surnageant) et insolubles (culot) ont été resuspendues dans du tampon d'électrophorèse (voir ci-dessous) et utilisées comme sources antigéniques en immunobuvardage.

Des extraits cytoplasmiques et nucléaires de cellules HeLa ont été préparés comme suit: 2×10^9 cellules ont été resuspendues dans un tampon isotonique (10 mM HEPES/hydroxyde de potassium, 140 mM KCl, pH 7.9). Les membranes cytoplasmiques ont été brisées par homogénéisation à l'aide d'un Dounce. Après microcentrifugation, la fraction cytoplasmique a été conservée et les noyaux ont ensuite été resuspendus dans un tampon hypotonique (10 mM HEPES/hydroxyde de potassium, 2.5 mM $MgCl_2$, 440 mM NH_4Cl , 25% glycérol, pH 7.9). L'homogénat nucléaire a été agité sur glace pendant 30 minutes, puis centrifugé à 50000 xg / 20 minutes. Le surnageant a été dialysé contre le tampon isotonique contenant 25% glycérol. Les deux fractions ont finalement été concentrées sur Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA, USA), puis conservées à $-20^{\circ}C$ afin d'être utilisées comme matériel antigénique (Harmuth et Barta, 1987; Hassfeld et al., 1989).

2.5.4 Filaments intermédiaires (FI). Les FI ont été isolés et purifiés à partir de cellules HeLa et Pt K2 en utilisant leur propriété d'insolubilité en présence de détergeants non ioniques (Steinert, 1982; Starger et al., 1978). De plus, les cellules ont été traitées ou non avec 1 μM de colcemide (Sigma, St-Louis, MO, USA) pendant 24 heures à $37^{\circ}C$ afin d'induire l'agrégation des FI (Franke et al., 1979). Brièvement, les cellules sont lysées dans un tampon PBS contenant 0.6 M KCl, 1% Triton X-100, 10 mM $MgCl_2$, 0.5 mM PMSF, 1 mg/ml N-p-tosyl-L-arginine méthyl ester HCl (TAME) et 0.5 mg/ml DNase 1 (Sigma, St-Louis, MO, USA). Le culot de FI est ensuite resuspendu (concentration en protéine:1mg/ml) dans 5 mM

Tris-HCl, 1mM dtt, 1mM acide N,N'-tetra-acétique, et 1 mg/ml TAME, homogénéisé, dialysé contre 1000 volumes de PBS / 16 heures à 4°C et utilisé comme source antigénique à une concentration de 25 µg/puits. De la vimentine purifiée provenant du cristallin de boeuf (Sigma, St-Louis, MO, USA) a également été utilisée comme filament intermédiaire témoin en immunobuvardage, à une concentration de 15 µg/puits.

2.5.5 Antigènes associés au virus Epstein Barr (EBV). Des lignées cellulaires infectées ou non par EBV ont été généreusement fournis par les Drs. J. Jonca et C. Alfieri, de l'hôpital Ste-Justine de Montréal. Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes B humaines BL41, dérivées d'un lymphôme de Burkitt, ont été préalablement infectées avec deux souches d'EBV: soit avec le virus transformant B95.8 (BL41/B95.8) codant pour les deux antigènes nucléaires EBNA-1 (73 kD) et EBNA-2 (88 kD) associés à EBV, soit avec le virus atypique P3HR-1 (délétion BamH1 de la région codante pour EBNA-2; BL41/P3HR-1) codant uniquement pour EBNA-1. Les cellules BL41 non infectées sont utilisées comme lignée cellulaire témoin (EBV⁻). Les cellules ont été mises en culture dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal, tel que décrit ci-haut. Les extraits cellulaires ont été obtenus par la méthode de lyse totale des cellules (Sculley et al., 1985). Brièvement, après deux lavages consécutifs dans du PBS, pH 7.4, froid, le culot d'environ 1×10^7 cellules a été resuspendu (1:1) dans un tampon de lyse 2X contenant 6% SDS, 2 mM 2-mercaptoéthanol, 140 mM Tris-HCl pH 7.0, 2% glycérol et 0.07% bromophénol bleu. Les échantillons ont ensuite été soniqués (sonicateur modèle 300, Ficher Scientific) pendant 30 secondes, bouillis pendant 2 minutes et microcentrifugés 5 minutes à 15000 xg. Les surnageants ont été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse en immunobuvardage (150 µg ou 10^6 cellules par puits).

2.5.6 Protéines de stress (HSPs). Les HSPs ont été induites à partir de cellules HeLa en culture par la méthode de choc thermique (De Benedetti et Baglioni, 1986). Sommairement, les cellules HeLa ont été mises en culture tel que décrit ci-haut. L'induction des HSPs a été effectuée en resuspendant les cellules dans du milieu de culture pré-équilibré à 42.5°C (5×10^5 cellules/ml) et en poursuivant l'incubation pour un total de 2 heures à cette même température. Des échantillons ont été prélevés aux temps 0, 60 et 120 minutes afin d'évaluer le niveau d'induction. Les lysats totaux de cellules, avant et après traitement, ont été obtenus en resuspendant le culot cellulaire dans 2 volumes de tampon hypotonique contenant 20 mM KCl, 1.5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM dtt, 20 mM HEPES pH 7.4 et 0.5% Triton X-100. Après centrifugation à 13000 xg durant 15 minutes à 4°C, les surnageants ont été conservés à -20°C et analysés en immunobuvardage (l'équivalent de 10^6 cellules/puits).

De plus, des échantillons de HSPs humains et mycobactériens ont été utilisés comme sources antigéniques de référence. La protéine de stress recombinante humaine de 60 kD (HSPr 60kD) purifiée a été gracieusement fournie par le Dr. R.S Gupta (McMaster University, ON). Cette protéine de fusion (P1A) a été purifiée par électroélution à partir d'un gel SDS-PAGE, puis lyophilisée. Deux protéines de stress mycobactériennes recombinantes ont été fournies par le Dr. JDA van Embden du *CDC/UNDP/World Bank/WHO Special Programme* sous forme de lyophilisats: HSP 70 kD et HSP 65 kD isolées à partir de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* respectivement. Ces échantillons ont été utilisés en immunobuvardage à une concentration d'environ 100 µg/puits.

2.6 PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

Dû à la présence de l'antigène Sa dans tous les placentas de même qu'à la facilité d'obtenir le tissu, l'EPH semi-purifié sur DEAE cellulose (fraction 300 mM NaCl;

voir ci-haut) a été purifié ultérieurement par chromatographie préparative haute performance (HPLC) en gradient de sel (Lee, 1990; Rounds et al., 1986). La séparation s'est effectuée à l'aide du système de purification modèle 650E et d'une colonne AP-2 (20 mm x 100 mm) contenant une résine d'échange d'anions haute résolution DEAE-15HR (Waters/Millipore, Milford, MA, USA). À cet effet, environ 250 mg de protéines de l'EPH-300 mM NaCl ont été dilués dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 afin d'obtenir une concentration finale de 120 mM NaCl, puis filtrés sur membrane de 0.45 µm avant la chromatographie. L'échantillon a par la suite été chargé, avec un débit de 2 ml/minute, sur la colonne de DEAE-15HR pré-équilibrée dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl (tampon de séparation). Après 10 volumes de lavages avec le tampon de séparation, les protéines ont été éluées avec un gradient de 120 à 300 mM NaCl dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, échelonné sur un temps de 120 minutes. L'élution des protéines a été suivie à 280 nm (sensibilité de 0.5) avec un détecteur U.V. Waters 441 (Millipore, Milford, MA, USA) et des fractions de 2 ml ont été recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions FRAC-100 (Pharmacia, Uppsala, Suède). Le profil de séparation en gradient a été tracé à l'aide d'une imprimante (Millipore, Milford, MA, USA) réglée à 0.25 cm/minute. Les protéines des différentes fractions ont été soit analysées par la technique immunoenzymatique (ELISA), soit précipitées avec 30% d'acide trichoroacétique, lavées à l'acétone et séchées afin d'être analysées en immunobuvardage. Les fractions riches en antigène Sa, sous forme de protéines natives, ont également été utilisées comme sources antigéniques en immunodiffusion de même que pour des protocoles d'absorptions de sérums (décrit ci-dessous).

2.7 TECHNIQUE IMMUNOENZYMATIQUE – ELISA.

Le profil chromatographique de la purification de l'EPH par HPLC préparative a été subséquentement analysé par ELISA (Kemeny, 1992; Stuart et Dixon, 1983; Voller et

al., 1980). Cent cinquante (150) μ l de chacune des fractions purifiées ont été déposés dans les puits d'une plaque à 96 puits à fond plat en PVC (Costar, Cambridge, MA, USA) et fixés pour la nuit à 4°C. La plaque a ensuite été saturée pendant 1 heure à 37°C avec du PBS contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA; Sigma, St-Louis, MO, USA) et 3% de gélatine de poisson (Norland, New Brunswick, NJ, USA). Après 4 lavages dans du PBS, pH 7.4, 0.05% BSA, 0.1% gélatine de poisson, 0.05% Tween 20 (solution de lavage), les sérums rhumatoïdes anti-Sa positifs dilués dans la solution de lavage ont été incubés pendant 1 heure à 25°C. Des sérums provenant d'individus normaux ont été utilisés comme témoins. Après 4 lavages entre chacune des étapes, les puits ont été incubés pendant 1 heure avec un antisérum de chèvre anti-IgG (Fc) humain biotinylé et pendant 30 minutes avec de la streptavidine couplée à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), tous deux dilués 1/2000 dans le tampon de lavage. Après ces incubations, la plaque a été lavée à 6 reprises dans le tampon de lavage et les anticorps spécifiquement liés ont été révélés par l'ajout de tampon 0.3M acide citrique, 0.05M phosphate, pH 4.6, contenant 0.02% H_2O_2 et 1 mg/ml d'orthophénylènediamine (OPD; Sigma, St-Louis, MO, USA). Une fois la coloration apparente, la réaction a été arrêtée par l'addition de H_2SO_4 4.0 N et la plaque a finalement été interprétée à 450 nm avec un spectrophotomètre MCC/340 (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, McLean, VA, USA). Des puits témoins ont été effectués avec l'anticorps ou l'antigène seul en présence de l'ensemble des réactifs, tandis que le blanc a été obtenu à l'aide de l'ensemble des réactifs, en absence de la source antigénique de même que de l'anticorps.

2.8 CLONAGE DE LA PROTÉINE DISULFURE ISOMÉRASE (PDI) PAR LA RÉACTION EN CHAÎNE DE POLYMERASE (PCR)

Des oligonucléotides (25 bases) complémentaires aux deux extrémités de la séquence de la PDI (Pihlajaniemi et al, 1987), 5'-CGGGATCCGGCTTTGCGTATTACAG-3' et 5'-AAGGATCCGACATGCTGCGCCGCGC-3' possédant chacun un site BamHI, ont été utilisés en PCR afin d'amplifier l'ADNc à partir d'un plasmide bactérien (pcD/PDI) contenant la pleine longueur du fragment codant pour la protéine (p5A5; ATCC, Rockville, MY, USA) (Sambrook et al., 1989). La réaction de PCR contenant les oligonucléotides, le plasmide de même que la Taq polymérase (Pharmacia, Uppsala, Suède) a été soumise à 30 cycles de dénaturation à la chaleur (94°C, 1 minute), de réassociation (55°C, 2 minutes) et d'extension (72°C, 3 minutes). Le produit d'environ 1500 paires de bases obtenu a été ultérieurement digéré par BamHI, isolé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Southern, 1979; Ausubel et al., 1992) et purifié à l'aide du système *Geneclean* (BioCan/Bio 101, La Jolla, CA, USA). Ce fragment d'ADNc correspondant à la PDI a par la suite été sous-cloné au site BamHI du vecteur pUC19 afin d'être postérieurement séquencé (voir séquençage de l'ADN) et sous-cloné dans un vecteur du système d'expression pGEX (voir expression et purification de protéines de fusion et recombinantes).

2.9 CRIBLAGE D'UNE BIBLIOTHÈQUE D'ADNc AVEC DES SÉRUMS DE PATIENTS RHUMATOÏDES.

Une bibliothèque d'expression de placenta humain dans le phage λ gt11 contenant 2.4×10^6 clones amorcés en oligo(dt) (Clontech, Palo Alto, CA, USA) a été criblée à l'aide d'autoanticorps de patients atteints de PR (Figure 3) (Prchal et al., 1987; Young et Davis, 1983). Brièvement, des bactéries *E. coli* Y1090r⁻ (Clontech, Palo Alto, CA, USA) ont été mises en culture pendant 16 heures à 37°C dans du milieu Luria-Bertani (LB; 1% tryptone, 0.5% extrait de levure, 0.5% NaCl, autoclavé)

contenant 10 mM MgSO₄, 0.2% maltose et 100 µg/ml d'ampicilline. Les Y1090r⁻ ont été infectées en incubant 2 ml de bactéries avec 4 x 10⁵ phages pendant 20 minutes à 37°C, et ceci pour chaque boîte de Pétri de 245 x 245 mm (Nunc/Gibco/BRL, Burlington, ON) utilisée. Chaque infection a par la suite été ajoutée à 50 ml d'agar de surface contenant 0.7% d'agarose dans du milieu LB et déposée à la surface d'un Pétri possédant environ 250 ml d'agar de fond (1.5% agar dans du milieu LB) avec 100 µg/ml d'ampicilline. Ils ont ensuite été incubés pour une période de 3–4 heures jusqu'à l'apparition de plages de lyse. Les Pétris ont ensuite été recouverts d'une membrane de nitrocellulose (Hybound, Amersham, Arlington Heights, IL) préalablement saturée dans 10 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Promega, Madison, WI, USA) et incubés pour 4 heures à 37°C afin d'induire d'expression de protéines fusionnées à la β-galactosidase. Deux membranes de nitrocellulose ont été utilisées pour chaque Pétri afin de s'assurer de la positivité d'un clone. Les membranes ont par la suite été lavées dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (TBS-T) et bloquées la nuit à 4°C dans du TBS-T contenant 5% de gélatine de poisson (Norland, New Brunswick, NJ, USA). Après un lavage dans le TBS-T, les membranes ont été incubées pour 1 heure à 25°C avec un pool de trois sérums rhumatoïdes absorbés avec Y1090r⁻ (voir sérums de patients ci-haut) et dilué 1/200 dans le TBS-T. Après 3 lavages dans 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Triton X-100 (tampon A), les anticorps liés à la membrane ont été détectés à l'aide d'un antisérum de chèvre anti-IgG humain couplé à la phosphatase alcaline (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) dilué 1/2000 dans le tampon A. Les membranes ont été lavées abondamment dans le tampon A, puis équilibrées dans 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ et finalement révélées avec le substrat BCIP/NBT (Promega, Madison, WI, USA). La réaction a été arrêtée dans de l'H₂O contenant quelques gouttes d'acide acétique glacial.

Criblage d'une librairie d'expression

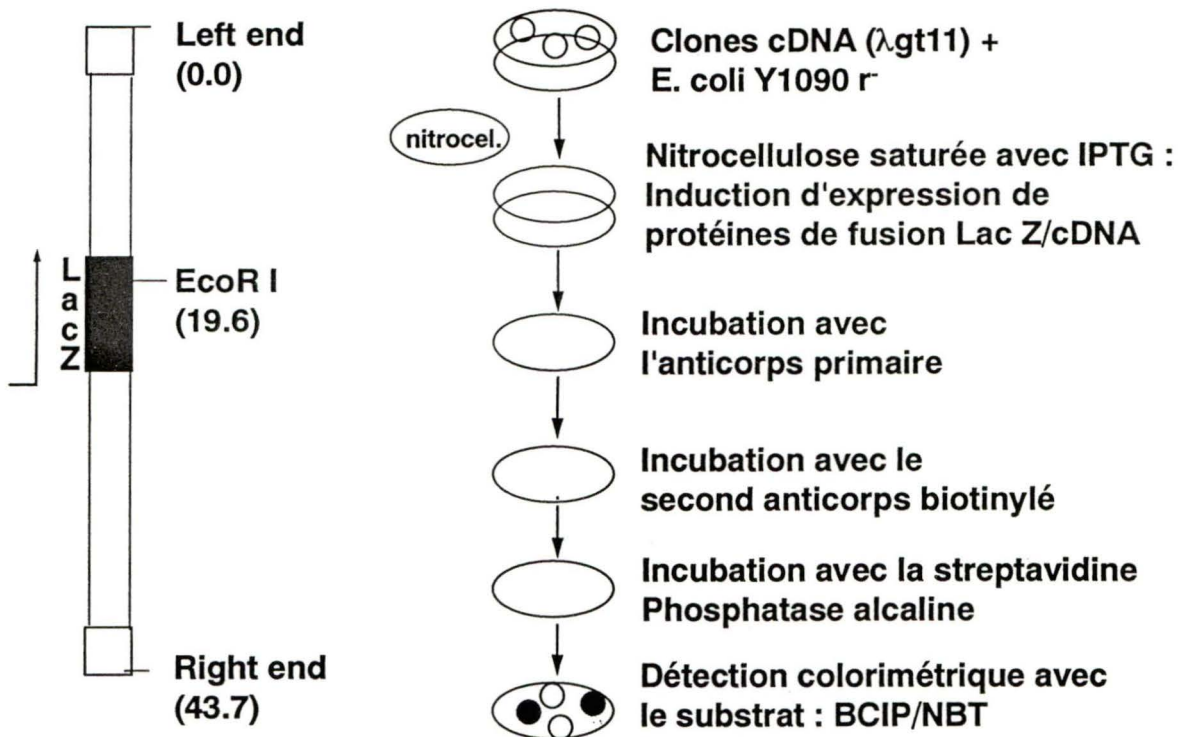


Figure 3: Représentation schématique de la méthode de criblage d'une bibliothèque d'expression d'ADNc. Les clones d'ADNc insérés au site EcoRI du vecteur λ gt11 (à gauche) sont mis en plaque avec des bactéries *E. coli* Y1090^r (à droite). Une fois les plaques de lyse obtenues, l'induction de protéines de fusion (Lac Z/ADNc) est effectuée en étalant une membrane de nitrocellulose saturée d'IPTG 10 mM à la surface du Pétri. Les protéines de fusion liées à la membrane de nitrocellulose sont détectées à l'aide d'un mélange de sérum de patients (anticorps primaire), puis par la technique avidine-biotine. Les anticorps spécifiquement liés aux protéines de fusion sont finalement détectés avec une méthode colorimétrique utilisant le BCIP/NBT comme substrat pour la phosphatase alcaline.

Les clones de bactériophages correspondant aux plages de lyse détectées par les anticorps ont été resuspendus dans 50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 15 mM MgSO₄, 0.1% gélatine (SM) et purifiés sur Pétri de 100 x 15 mm (Baxter, Mississauga, ON) par dilutions limites. Afin d'écarter la possibilité de détecter des faux positifs, les phages positifs ont été mélangés (1:1) avec le phage λ gt11 de l'ovalbumine de poulet comme témoin (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Ces mélanges, de même que les phages positifs purs, ont été recriblés sur nitrocellulose avec le pool de sérums et des sérums rhumatoïdes individuels. Des sérums d'individus normaux de même qu'un anticorps polyclonal de lapin anti-ovalbumine de poulet ont été utilisés comme témoins.

Les clones de bactériophages λ gt11 positifs ont par la suite été amplifiés par la technique de lyse sur Pétri avec les *E. coli* Y1090r⁻ (Sambrook et al., 1989). L'ADN phagique a été isolé en utilisant le système de purification de lambda sur colonne Tip-100 (QIAGEN, Chastworth, CA, USA). Après digestion par EcoR1 et séparation par électrophorèse en gel d'agarose 1% (Southern, 1979; Ausubel et al., 1992), les fragments d'ADNc ont été isolés à partir du gel et purifiés à l'aide du système *Geneclean* (BioCan/Bio 101, La Jolla, CA, USA). Ces fragments ont été sous-clonés dans un premier temps dans le vecteur pUC19 afin d'être séquencés (voir séquençage de l'ADN) et dans un second temps dans un vecteur du système d'expression pGEX (voir expression et purification de protéines de fusion et recombinantes).

2.10 SÉQUENÇAGE DE L'ADN

Les fragments ont ensuite été sous-clonés à l'aide de la T4 ADN ligase (Ausubel et al., 1992), dans le vecteur pUC19 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) prédigéré par BamHI (pour la PDI) ou par EcoR1 (pour la calpastatine) et

déphosphorylé à l'aide de la phosphatase alcaline (Pharmacia, Uppsala, Suède). Les bactéries compétentes *E. coli* JM109 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) ont été transformées en les incubant avec les produits de ligation pendant 10 minutes sur glace, puis 5 minutes à 37°C et en les étalant sur Pétri contenant de l'agar de fond et 100 µg/ml d'ampicilline. L'ADN plasmidique des bactéries transformées a été isolé par minipreps selon la technique de lyse alcaline (Birnboim, 1983). L'efficacité des ligations a été confirmée par la digestion des plasmides avec l'enzyme de restriction respectif. Le séquençage des fragments d'ADNc a été réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique A.L.F.TM (Pharmacia, Uppsala, Suède) selon la technique didéoxy (Sanger et al, 1977) en utilisant des amorces d'oligonucléotides fluorescents (Pharmacia, Uppsala, Suède) (Centre de recherche Louis-Charles Simard, Institut du Cancer de Montréal, Hôpital Notre-Dame). Les séquences nucléotidiques ont été analysées avec les banques de données GeneBank/EMBL (NCBI/BLAST network service).

2.11 EXPRESSION ET PURIFICATION DE PROTÉINES DE FUSION ET RECOMBINANTES.

Les fragments d'ADNc (PDI ou calpastatine) isolés à partir du vecteur pUC19 ont été sous-clonés, soit dans le vecteur pGEX-4T-1, soit dans le vecteur pGEX-KG (Pharmacia, Uppsala, Suède). Le système pGEX a été mis au point afin de permettre l'induction et la purification par affinité de protéines recombinantes fusionnées en C-terminal à la GST (27 kD) comme protéine porteuse et d'un site de clivage par la thrombine localisée entre la protéine recombinante et la GST. Ces protéines de fusion purifiées peuvent donc être utilisées directement ou libérées de la GST par clivage à l'aide de la thrombine (Smith et Johnson, 1988; Abath et Simpson, 1991). Brièvement, le pGEX-4T-1 a été utilisé pour le sous-clonage de l'ADNc de la calpastatine et le pGEX-KG pour celui de la PDI. Ces deux vecteurs ont été

digérés par EcoRI et BamHI respectivement, puis déphosphorylés par la phosphatase alcaline et assemblés à l'aide de la T4 ligase avec leur fragment d'ADNc respectif. Ces constructions ont ensuite été transfectées dans les bactéries compétentes PR745 *lon*⁻ (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) et la taille de même que l'orientation de l'insert d'ADNc ont été confirmées par digestion à l'aide d'enzymes de restriction spécifiques. Les transformants parentaux (vecteur seul) et recombinants (vecteur + insert) ont été mis en culture à 37°C dans du milieu TY (1.6% tryptone, 1% extrait de levure, 0.5% NaCl) contenant 100 µg/ml d'ampicilline, jusqu'à ce que la densité optique (D.O.)₅₉₅ atteigne entre 0.5 et 1.0. Un échantillon témoin de 1 ml de culture a été prélevé avant l'induction de l'expression de protéines de fusion (transformants non-induits). Le reste de la culture a été induit pendant 2 heures avec 1 mM d'IPTG et les bactéries ont ensuite été centrifugées à 7700 xg durant 10 minutes à 4°C. Après avoir resuspendu le culot dans du PBS contenant 1 mM PMSF et 1% Triton X-100 (50 µl/ml de culture), les bactéries ont été lysées par sonication avec 3 impulsions de 15 secondes chacune. Le sonicat bactérien a été centrifugé à 12000 xg pour 10 minutes à 4°C et le surnageant déposé sur une colonne de Glutathione Sépharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Suède; 0.5 ml/litre de culture) pré-équilibrée avec le PBS-1% Triton X-100. Après un lavage avec 10 volumes de colonne de PBS, les protéines de fusion ont été éluées par l'ajout de PBS contenant 10 mM Glutathione (1 ml/ml de gel). Finalement, les protéines recombinantes ont été obtenues par le clivage de la GST directement sur la colonne, en incubant 10 Unités de clivage de thrombine (Sigma, St-Louis, MO, USA; 1 unité de clivage = 0.2 unités NIH) pour chaque mg de protéines de fusion, pendant 3 heures à 25°C.

2.12 ABSORPTIONS DE SÉRUMS

Un protocole d'absorption a été élaboré afin de vérifier la spécificité de la réaction des anticorps contre certains antigènes analysés dans cette étude. Les sources antigéniques utilisées pour ces absorptions comprennent 1) l'extrait de placenta humain semi-purifié et purifié par chromatographie d'échange d'ions, 2) les extraits de lignées cellulaires infectées ou non par EBV, 3) les différentes HSPs, 4) la vimentine bovine (Sigma, St-Louis, MO, USA), et 5) les protéines de fusion et recombinantes purifiées. Les concentrations d'antigènes employées afin d'éliminer le maximum de réactivité sont décrites dans les légendes des figures. Ces absorptions ont été accomplies en utilisant des sérums à des dilutions appropriées afin d'éviter un excès d'anticorps. La concentration d'anticorps utilisée constitue une des variables les plus importantes à considérer afin d'éliminer de façon efficace la réactivité croisée du sérum étudié. Pour ce faire, les sérums ont été préalablement titrés en immunobuvardage avec des concentrations constantes d'antigène (e.g. EPH, protéines recombinantes, etc) dans le but de déterminer la dilution maximale donnant un signal significatif de liaison entre l'anticorps et l'antigène. Une fois le titre des anticorps déterminés, les sérums et les témoins dilués ont été incubés avec des concentrations croissantes (entre 1 et 20 mg de protéines purifiées et entre 50 µg et 1 mg de protéines recombinantes) de source antigénique afin d'éliminer le maximum de réactivité croisée. L'absorption des sérums s'est effectuée à 37°C pendant une heure et à 4°C pour la nuit sous agitation, en absence de tout inhibiteurs de protéases et de détergeants. Après centrifugation à 7000 xg pour 10 minutes, les surnageants ont été récupérés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation en immunobuvardage. Des sérums normaux et des anticorps dirigés spécifiquement contre les antigènes étudiés (e.g. anti-vimentine, anti-HSP, anti-EBNA) ont été utilisés comme source d'anticorps témoins. Ces sérums témoins ont été traités selon les mêmes conditions

d'absorptions. De plus, des sérums non absorbés aux mêmes dilutions ont été utilisés comme une autre source de témoins.

2.13 ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)

Les différentes sources antigéniques décrites ci-haut ont été séparées par électrophorèse en conditions réductrice et dénaturante SDS-PAGE (Laemli, 1970) en utilisant comme gel séparateur deux concentrations d'acrylamide distinctes. Pour certains échantillons, les protéines ont été séparées sur gel discontinu contenant 15% d'acrylamide, pH 8.8 (ratio acrylamide/bisacrylamide: 36.5/1), tandis que d'autres ont été séparées selon les mêmes conditions dans un gel contenant 10% d'acrylamide, pH 8.8 (ratio acrylamide/bisacrylamide: 37.5/1). Dans les deux cas, le gel concentrateur utilisé était de 4% d'acrylamide, pH 6.8. Les échantillons de protéines ont été dénaturés dans le tampon d'échantillon (2X) composé de 2% SDS, 10% glycérol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 et 5% 2-mercaptoéthanol. Ces échantillons ont ensuite été bouillis durant 3 minutes dans un bain-marie, puis déposés au fond du puits respectif. L'électrophorèse a été effectuée à 150 Volts durant 1 heure à la température de la pièce, à l'aide du *Mini Protean II system* (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), dans un tampon d'électrophorèse contenant 1% SDS, 25 mM Tris et 0.25 M glycine. Le *Rainbow High Molecular Weight Markers* (Amersham, Arlington Heights, IL, USA), le *Prestained* et le *Biotinylated SDS-PAGE Low Range Standards* (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) ont été employés comme marqueurs de poids moléculaire. De plus, l'immunoglobuline G normale humaine (IgG) purifiée par affinité (Goding, 1976) sur colonne de Sépharose 6MB couplée à la Protéine A (Pharmacia, Uppsala, Suède), a été employée d'une part comme source antigénique en immunobuvardage, et d'autre part comme marqueur de poids moléculaire.

2.13.1 Coloration des protéines dans les gels de polyacrylamide. Dans le cas où les échantillons n'ont pas été transférés pour détection ultérieure en immunobuvardage, l'analyse des protéines du gel a été effectuée en utilisant les méthodes de coloration au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent. Pour la coloration au bleu de Coomassie (Towbin et al., 1979), les gels ont été incubés dans une solution de coloration (0.05 % Bleu de Coomassie, 50% méthanol, 10% acide acétique glacial) pour une période de 4–16 heures, puis lavés avec une solution de décoloration (50% méthanol, 10% acide acétique glacial) jusqu'à ce que l'intensité des bandes polypeptidiques soit convenable. Dans le cas de la coloration au nitrate d'argent, le gel a été fixé toute la nuit dans une solution contenant 30% d'éthanol et 10% d'acide acétique glacial. Il a ensuite été lavé avec 2 changements d'éthanol 30% et 3 changements d'H₂O bidistillée–déionisée, puis incubé pendant 30 minutes, sous agitation, dans une solution 1% AgNO₃. Le gel a par la suite été lavé abondamment avec de l'H₂O bidistillée–déionisée et révélé dans une solution de 2.5% carbonate de sodium, 0.02% formaldéhyde, jusqu'à ce que le contraste voulu des bandes soit atteint. La réaction a été arrêtée avec une solution 1% acide acétique glacial. Les gels colorés au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent ont finalement été équilibrés dans du glycérol 10% et séchés sous vide à l'aide d'un séchoir de gel modèle 583 (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

2.14 IMMUNOBUVARDAGE

Les protéines séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide ont été électro-transférées à 100 Volts pour 1 heure sur membranes de nitrocellulose (Hybond, Amersham, Arlington Heights, IL, USA) dans un tampon de transfert contenant 25 mM Tris, 0.2 M glycine, pH 8.3 et 20% méthanol (Towbin et al., 1979, 1984). Les résultats présentés ici ont été obtenus en utilisant deux systèmes de détection

distincts, soit une technique colorimétrique (Gershoni et Palade, 1983), soit une technique de chemiluminescence (Bradd et al., 1993).

2.14.1 Immunodétection par méthode colorimétrique. Après électro-transfert, les membranes ont été bloquées pendant 4–16 heures à 4°C dans une solution contenant 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl (TBS) et 3% de gélatine de poisson (Norland, New Brunswick, NJ, USA). Les membranes de nitrocellulose ont ensuite été incubées pendant 1 heure avec le/les sérums ou anticorps respectifs dilués dans 150 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% Tween 20, 1% gélatine de poisson (Tampon A). Un appareil *Miniblotter II* (Immunetics, Cambridge, MA, USA), permettant d'analyser simultanément sur une même membrane plus de 25 échantillons sériques, a été utilisé lorsque différents sérums étaient analysés. Après 3 lavages dans le tampon A, les membranes de nitrocellulose ont été incubées 1 heure avec des anticorps de chèvre anti-IgG humains (Fc) biotinylés (ou dans certaines expériences anti-IgM et anti-sous classes d'IgG1,2,3,4) dilués 1/2000 dans le tampon A. Les membranes ont par la suite été incubées 30 minutes avec de la streptavidine couplée à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluée 1/2000 dans le tampon A. Les membranes ont ensuite été lavées dans un tampon 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 M NaCl, 0.1% Tween 20 et finalement équilibrées dans du TBS. Les bandes polypeptidiques spécifiques ont été révélées dans une solution de 10% méthanol, 0.015% H₂O₂ avec 0.06% de 4-chloro-1-naphtol (Sigma, St-Louis, MO, USA) comme substrat.

Le criblage des sérums de patients rhumatoïdes et des témoins a été effectué en utilisant cette technique de détection avec des extraits de placenta humain. Ces échantillons sériques en duplicata ont été analysés à l'aveugle et la faible réactivité de certains sérums a été considérée comme un résultat négatif. Enfin, dans le but de

vérifier la reproductibilité des résultats du criblage, des sérums aléatoires ont été analysés avec des préparations antigéniques de placentas différents.

2.14.2 Immunodétection par chemiluminescence. Après le transfert des protéines sur nitrocellulose, les membranes ont été bloquées pendant 4–16 heures à 4°C dans du PBS contenant 5% de lait en poudre, pH 7.4. Le reste des manipulations a été effectué à 25°C. Les membranes ont été incubées pour 1 heure avec le/les sérums dilués dans le PBS–5% lait. Dans le cas où plusieurs sérums ou anticorps différents ont été incubés avec la même membrane, l'appareil *Miniblotter II* tel que décrit ci-haut a été employé. Après 3 lavages dans du PBS–0.5% lait, pH 7.4, les anticorps liés à la membrane ont été détectés à l'aide de la protéine A couplée à la peroxydase (ICN, Costa Mesa, CA, USA) diluée dans le PBS–0.5% lait. À la suite de lavages abondants dans du PBS, les bandes polypeptidiques spécifiques ont été révélées à l'aide du système de détection ECL (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) en exposant un film XAR–5 (Kodak) entre 30 secondes et 5 minutes selon l'intensité voulue.

2.15 ANALYSE D'IMAGE

Les résultats obtenus, en immunobuvardage par chemiluminescence, de la réactivité anti-Sa avec ou sans absorption avec les protéines de fusion de même que recombinantes, ont pu être analysés et quantifiés à l'aide du système informatisé de traitement d'image Mocha (Image Analysis Software, Jande Scientific) équipé d'une caméra vidéo modèle TK–1070U (JVC) et d'un réflecteur VariQuest 100 (Fotodyne Inc.).

2.16 MICROSÉQUENÇAGE DES PROTÉINES

Après la purification de l'autoantigène Sa du placenta par HPLC (voir chromatographie d'échange d'ions), l'identification de la portion N-terminale des protéines a été effectuée par microséquencage en utilisant la méthode de cycle de dégradation d'Edman (Matsudaira, 1987, 1990). Brièvement, les fractions purifiées de la protéine immunoréactive ont été soumises à l'électrophorèse SDS-PAGE – 10% d'acrylamide (méthode décrite ci-haut), en utilisant cette fois-ci un grand gel de 20 cm de haut, à l'aide du système d'électrophorèse *Protean II* (Bio-Rad laboratories, CA, USA). Les protéines ont par la suite été électrotransférées, selon les conditions d'immunobuvardage (décrites ci-haut), sur membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF, immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA) préalablement rincée 1 minute dans 100% méthanol, 5 minutes dans l'H₂O bidistillée et équilibrée dans le tampon de transfert. Les protéines électro-transférées sur membrane de PVDF ont été directement colorées au bleu de Coomassie ou immuno-localisées à l'aide d'échantillons déposés dans les puits voisins. Les bandes polypeptidiques d'intérêt ont été excisées à l'aide d'une lame de rasoir, lavées dans de l'H₂O bidistillée stérile, séchées et conservées à –20°C.

Le microséquencage des bandes polypeptidiques associées à l'autoantigène Sa et transférées sur membrane de PVDF a été effectué au laboratoire J.A. De Sève de neuroendocrinologie moléculaire de l'Institut de Recherche Clinique de Montréal (Chapdelaine et al., 1993; Lazure et al., 1989). Sommairement, les bandes de PVDF ont été centrées sur un scellant en Teflon et placées dans la cartouche du séquenceur. Les protéines ont été séquencées (10–20 cycles, avec un rendement de 10–40 pmol.) à l'aide du séquenceur en phase gazeuse modèle 470A couplé directement à un analyseur de dérivés phénylthiohydantion (PTH) modèle 120A (Applied Biosystems). La composition en acides aminés a été déterminée avec un analyseur

d'acides aminés Beckman (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). Finalement, la séquence des résidus en N-terminal de chacune des bandes polypeptidiques a été comparée dans des banques de données (Swissprot, NBRF et Genbank).

2.17 PURIFICATION DES ANTICORPS PAR AFFINITÉ.

Les anticorps dirigés contre deux antigènes spécifiques (Sa et Ta) ont été obtenus en utilisant une technique d'élution acide sur membrane de nitrocellulose (Kaufmann et al., 1987; Smith et al., 1984; Olmsted, 1981). Sommairement, les protéines des extraits de rate et de placenta humains ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur membrane de nitrocellulose tel que décrit précédemment. Les bandes polypeptidiques spécifiques ont été localisées par la détection en immunobuvardage à l'aide des extrémités de la membrane. Une fois localisée, la zone spécifique du nitrocellulose a été coupée en morceaux qui ont été déposés dans un microtube de 1.5 ml. Après saturation dans 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5% lait en poudre (TSM), les morceaux retenant la protéine d'intérêt ont été incubés de 4-16 heures à 4°C avec un sérum sélectionné et dilué dans du TSM. Après des lavages abondants dans 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 M NaCl, 0.1% Tween 20, les anticorps spécifiques ont été élués avec un tampon d'élution contenant 100 mM glycine-HCl, pH 2.5, 0.1% Tween 20 (200 µl/membrane) pendant 10 minutes. Les éluats récupérés ont été neutralisés avec 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10% lait en poudre (1/10 du volume d'éluat). Les anticorps purifiés ont été immédiatement employés ou conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.18 TRAITEMENTS ENZYMATIQUES

Afin d'analyser la nature biochimique de l'autoantigène Sa, l'extrait de rate humaine a été digéré avec des enzymes clivant les acides nucléiques, les protéines et l'acide

sialique (Moore, 1981; Hassfeld et al., 1989; Daniel et al., 1987). Brièvement, l'extrait de rate, à une concentration de 10 mg/ml, a été incubé pendant 30 minutes à 37°C avec 100 µg/ml de RNase A (Calbiochem, San Diego, CA, USA) ou avec 400 µg/ml de DNase I (Pharmacia, Uppsala, Suède), toutes deux dans 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂ ou avec 100 µg/ml de protéinase K (Sigma, St-Louis, MO, USA) dans 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.2% SDS. La désialylation enzymatique a été effectuée en traitant l'extrait de rate pendant 2 heures à 25°C avec 2 U/ml de neuraminidase purifiée à partir de *Vibrio cholerae* (Sigma, St-Louis, MO, USA) dans 100 mM de citrate de sodium, pH 6.0. Des échantillons témoins ont été incubés dans les mêmes conditions, sans ajout d'enzyme. Les échantillons traités ou non avec ces divers enzymes ont été dénaturés dans le tampon d'électrophorèse 2X (1:1 v/v), puis analysés en SDS-PAGE et immunobuvardage.

2.19 IMMUNOFLUORESCENCE

Un test standard d'immunofluorescence indirecte (IFI) a été employé tout au long de l'étude en utilisant comme second anticorps des anti-IgG ou des anti-IgM couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Sanofi-Pasteur, Chaska, MN, USA; Hoechst-Behring, Marburg, Allemagne). Sommairement, les sérums dilués entre 1/5 et 1/100 dans le PBS ont été analysés sur plusieurs substrats. Ceux-ci incluent des préparations commerciales de cellules HEp-2 (Sanofi-Pasteur and Immuno Concept Inc., Sacramento, CA, USA), et des sections de rein, de foie et d'estomac de souris (Sanofi-Pasteur). Des cellules de la muqueuse buccale humaine ont été préparées à partir de donneurs sains exprimant l'antigène reconnu par les anticorps associés au FAP (Westgeest et al., 1989). De plus, des leucocytes humains obtenus à partir du sang périphérique ont été isolés par une méthode de sédimentation par gravitation dans du dextran suivie d'une centrifugation sur un gradient de Ficoll-Hypaque. La technique d'IFI a également été testée sur des coupes au cryostat

(5 μ m) non fixées de placenta et de rate humaines, en utilisant des sérums anti-Sa positifs de même que des sérums témoins. Les anticorps liés spécifiquement au substrat ont été détectés avec un antisérum de lapin anti-IgG humain-FITC.

RÉSULTATS

3.1 Identification de l'autoantigène Sa par immunobuvardage en utilisant des sérums de patients atteints de PR. La méthode utilisée afin d'obtenir l'ERH a été initialement mise au point pour identifier en immunobuvardage les autoanticorps anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) dans les sérums de patients atteints de maladies rhumatismales diverses (Boire et al., 1991). En utilisant l'ERH élué entre 200 et 250 mM NaCl sur DEAE en immunobuvardage, les sérums de patients reconnaissent des bandes polypeptidiques spécifiques (Figure 4). Les patients anti-SS-A(Ro) positifs reconnaissent principalement une bande polypeptidique de 60 kD (Figure 4, lignes 1 et 2). Certains sérums anti-SS-A(Ro) possèdent également des anticorps dirigés contre une protéine de 52 kD (Figure 4, ligne 1), tandis que d'autres ne reconnaissent que la bande de 60 kD (Figure 4, ligne 2). En incubant le sérum d'une patiente atteinte de PR (sérum original d'une patiente nommée Savoie), une seule bande polypeptidique de 50 kD est détectée (Figure 4, ligne 3). Ce sérum Sa détecte aussi l'autoantigène Ro en immunodiffusion, mais ne possède que des anticorps anti-Ro dirigés contre des épitopes conformationnels présents au niveau de la protéine Ro 60 kD native (Boire et al., 1991). Par conséquent, ce sérum n'a détecté aucune bande polypeptidique associée à la protéine Ro en immunobuvardage, en utilisant des extraits de cellules HeLa particulièrement riches en SS-A(Ro) de 52 et 60 kD et en SS-B(La) de 48 et 35 kD (résultats non présentés). Un second sérum rhumatoïde, négatif pour les systèmes SS-A(Ro) et SS-B(La), reconnaît aussi la bande polypeptidique associée à l'antigène Sa (Figure 4, ligne 4). De plus, l'autoantigène de 50 kD détecté par ces sérums est distinct de la protéine SS-B(La) de deux sous-unités de 48 et 35 kD, reconnue par un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) fortement positif (Figure 4, ligne 5). Lorsque le système Sa et le complexe IgG/anti-IgG associé au FR sont comparés, la bande polypeptidique correspondant à l'antigène Sa (50 kD) est distincte de la chaîne lourde de l'IgG (~55 kD) reconnue

par les anticorps anti-IgG (Figure 4, ligne 7). Finalement, le sérum d'un individu normal n'identifie aucune bande polypeptidique (Figure 4, ligne 6).

En utilisant des conditions de séparations particulières (grand gel et voltage plus faible), la bande polypeptidique de 50 kD associée à l'antigène Sa est composée d'un doublet (Figure 5, lignes 4 et 5). Les anticorps anti-Sa, purifiés par affinité sur membrane de nitrocellulose, reconnaissent également le doublet polypeptidique (Figure 5, ligne 4). En incubant cet ERH dépourvu de la RNP Ro de 52 kD avec le même sérum utilisé à la ligne 1 de la Figure 4, seule la bande 60 kD de la RNP Ro est reconnue (Figure 5, ligne 2). Cette réactivité montre que l'autoantigène Sa est encore une fois distinct des RNP Ro-52 et -60 kD (Figure 5, ligne 2). Les anticorps anti-Ro 60 kD purifiés détectent uniquement la bande polypeptidique associée au Ro de 60 kD (Figure 5, ligne 1).

Plusieurs autres sérums rhumatoïdes, dépourvus d'anticorps anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La), détectent la bande polypeptidique de 50 kD associée au Sa en utilisant l'ERH en immunobuvardage (Figure 6). Cette figure représente un criblage typique de sérums de patients atteints de PR et de témoins, de même que le patron de liaison des anticorps anti-Sa avec l'antigène Sa de l'ERH. Les sérums témoins anti-(SS-A)Ro positifs reconnaissent la bande polypeptidique de 60 kD (Figure 6, lignes 2 et 27), tandis que le sérum anti-Sa original ne reconnaît que la bande de 50 kD associée à l'antigène Sa (Figure 6, lignes 3 et 26). Sur un total de 22 sérums de patients rhumatoïdes testés, 10 reconnaissent spécifiquement la bande de 50 kD (Figure 6, lignes 4 à 25). Cette réactivité a donc été considérée comme anti-Sa positive. De plus, le titre des anticorps anti-Sa varie entre 1:50 et 1:1000 (résultats non présentés). Bien que l'isotype des anticorps anti-Sa ait pu être analysé pour quelques sérums (voir caractérisation du système autoimmun Sa/anti-Sa), la relation

entre le taux d'immunoglobulines sériques et le titre des anticorps anti-Sa n'a toutefois pas été déterminée et pourra être l'objet d'une étude clinique ultérieure.

3.2 Détection de l'antigène Sa dans le placenta humain. En raison de la difficulté à obtenir des prélèvements de rates humaines fraîches, des extraits de placenta humain (EPH) ont été examinés pour la présence de l'autoantigène Sa. L'EPH obtenu selon des conditions similaires à l'ERH (i.e. élué entre 200 et 300 mM NaCl sur DEAE) a été analysé en immunobuvardage (Figure 7). L'incubation du sérum anti-Sa original révèle trois bandes polypeptidiques spécifiques d'environ 50 kD qui semblent être associées à l'antigène Sa (Figure 7, ligne 1). Les poids moléculaires approximatifs de ces bandes polypeptidiques sont de 53, 50 et 49 kD. En incubant un second sérum anti-Sa positif identifié antérieurement avec l'ERH (Figure 6, ligne 25), ce sérum détecte aussi spécifiquement les trois bandes polypeptidiques liées au Sa dans l'EPH (Figure 7, ligne 3). Un sérum de patient atteint de LED avec des anticorps anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) reconnaît spécifiquement les bandes polypeptidiques associées aux RNP Ro de 52 kD et La de 48 et 35 kD (Figure 7, ligne 4). Le sérum d'un individu normal ne détecte aucune bande spécifique (Figure 7, ligne 2).

La figure 8 représente un criblage typique en immunobuvardage des anticorps anti-Sa dans les sérums de patients rhumatoïdes et de témoins à l'aide d'un EPH. Le sérum anti-Sa positif témoin, utilisé également à la ligne 3 de la figure 7, reconnaît spécifiquement le triplet (Figure 8, ligne 24), tandis que le sérum normal n'identifie aucune bande (Figure 8, ligne 25). Sur un total de 13 sérums de patients atteints de PR testés, 8 de ces échantillons reconnaissent spécifiquement les bandes associées à l'antigène Sa. Par contre, tous les patients non rhumatoïdes analysés ici n'ont pas d'anticorps anti-Sa détectables. La réactivité des anticorps contre l'autoantigène Sa

splénique et placentaire a été confirmée en testant les deux extraits en immunobuvardage avec 40 sérums rhumatoïdes anti-Sa positifs. Tous ont reconnu la bande de 50 kD au niveau de l'ERH de même que le triplet polypeptidique au niveau de l'EPH (résultats non présentés). De plus, il a été clairement démontré que l'antigène Sa identifié dans ces deux extraits possède des déterminants antigéniques communs (voir ci-dessous).

3.3 Identification de l'antigène Sa dans la membrane synoviale rhumatoïde. Afin de vérifier la présence de l'antigène Sa directement au niveau du tissu cible, des extraits semi-purifiés de membranes synoviales rhumatoïdes ont été analysés en immunobuvardage (Figure 9). Lorsque l'ESH obtenu après élution entre 200 et 300 mM NaCl sur DEAE est incubé avec le sérum Sa original, deux bandes polypeptidiques majeures sont révélées (Figure 9, ligne 2). Les poids moléculaires approximatifs sont identiques à ceux obtenus avec l'EPH, soit 53 et 50 kD. Lorsque l'ESH est séparé avec des conditions permettant une meilleure résolution, la bande de faible poids moléculaire consiste aussi en un doublet polypeptidique dont la bande inférieure est d'environ 49 kD. Ces poids moléculaires correspondent donc à ceux obtenus avec l'EPH. Le sérum d'un patient atteint de LED détecte spécifiquement la bande associée à l'antigène Ro de 60 kD (Figure 9, ligne 3). Un second sérum rhumatoïde anti-Sa positif (identifié à l'aide de l'ERH et de l'EPH) reconnaît les mêmes bandes polypeptidiques que le sérum Sa original (Figure 9, ligne 4). Le sérum d'un individu normal ne détecte aucune bande (Figure 9, ligne 1).

3.4 L'antigène Sa isolé de la rate, du placenta et de la synoviale rhumatoïde possède des déterminants antigéniques communs. Afin de déterminer la relation antigénique entre les trois extraits tissulaires humains décrits ci-haut (ERH, EPH et ESH), une analyse comparative en immunobuvardage a été effectuée à l'aide d'un

sérum Sa spécifique, de même que d'anticorps anti-Sa purifiés par affinité (Figure 10). Un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) positif reconnaît les deux bandes polypeptidiques associées au Ro-60 kD et au La-48 kD dans les extraits de rate et de placenta humains (Figure 10, ligne 2). Bien que ces deux systèmes soient reconnus par ce sérum, la RNP La ne semble pas présente en quantité détectable dans l'ESH (Figure 10, ligne 2). Le sérum anti-Sa original détecte les bandes polypeptidiques spécifiquement associées à l'antigène Sa dans les trois tissus, soit la bande de 50 kD dans l'ERH et les deux bandes majeures (53 et 50 kD) dans l'ESH et l'EPH (Figure 10, ligne 3). Les anticorps anti-Sa, purifiés à partir de la bande de 50 kD l'ERH ou des deux bandes majeures de l'EPH sur membrane de nitrocellulose, reconnaissent remarquablement bien les mêmes bandes polypeptidiques au niveau des trois extraits tissulaires (Figure 10, lignes 4 et 5). Cette observation suggère donc un partage antigénique important du polypeptide Sa dans ces tissus. Le sérum normal utilisé comme témoin ne détecte aucune bande (Figure 10, ligne 1).

3.5 Détection des autoanticorps anti-Sa dans les liquides synoviaux rhumatoïdes.

Des liquides synoviaux prélevés chez des patients et des témoins ont été testés en immunobuvardage sur les extraits de placenta et de synoviale rhumatoïde (Figure 11). Le sérum témoin anti-Sa positif reconnaît spécifiquement les trois bandes polypeptidiques liées au Sa du placenta et du tissu synovial humains (Figure 11A et B, ligne 2). Lorsque plusieurs échantillons de liquides synoviaux sont incubés avec l'EPH, seuls les prélèvements provenant de patients rhumatoïdes détectent les bandes polypeptidiques associées à l'antigène Sa (Figure 11A, lignes 7 à 9). Le patron de liaison est identique à celui obtenu avec le sérum anti-Sa témoin, mais avec un taux d'anticorps légèrement plus faible dans les liquides synoviaux. De plus, les liquides synoviaux anti-Sa incubés dans les lignes 8 et 9 sur l'EPH détectent aussi le triplet polypeptidique dans l'ESH (Figure 11B, lignes 3 et 4). Jusqu'à présent, l'ensemble

des patients ayant des anticorps anti-Sa dans leurs prélèvements synoviaux possèdent également l'anticorps au niveau sérique.

3.6 Caractérisation du système autoimmun Sa/anti-Sa. L'isotype des anticorps anti-Sa a été analysé en immunobuvardage à l'aide d'anticorps secondaires dirigés contre les IgM ou les IgG humaines (Figure 12). Seuls les anticorps anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) de classe IgG provenant d'un sérum lupique reconnaissent spécifiquement les deux bandes associées aux RNP Ro et La (Figure 12B, ligne 2). L'analyse de plusieurs sérums rhumatoïdes montre que les anticorps anti-Sa sont principalement d'isotype IgG (Figure 12, lignes 3 à 8). Deux de ces 6 sérums possèdent simultanément des anticorps anti-Sa d'isotype IgM (Figure 12A, lignes 4 et 5). L'analyse du profil clinique a démontré l'existence d'une PR sévère chez ces deux patients. Malgré le petit nombre de patients analysés (12 sérums), aucun sérum rhumatoïde ne possède des anticorps anti-Sa de classe IgM sans avoir des anticorps de classe IgG de façon concomitante (Figure 12, lignes 9 à 14). De plus, les IgG anti-Sa ont été caractérisés de façon plus approfondie quant aux sous-classes impliquées. Cela a été réalisé avec l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'IgG 1, 2, 3 ou 4 humaine. Bien que l'IgG₃ semble être la principale sous-classe impliquée dans la réponse anti-Sa, les trois autres sous-classes (IgG_{1,2} et 4) ont aussi été détectées (résultats non présentés).

Initialement, l'antigène Sa semblait représenter une des RNP bien connues parmi les systèmes autoimmuns liés à certaines maladies rhumatismales particulières (e.g. SS-A(Ro), SS-B(La), Sm ou U1RNP). Ces RNP migrent directement dans les régions de 40–60 kD en SDS-PAGE. Plusieurs évidences ont démontré que ce n'est pas le cas. Premièrement, les anticorps anti-Sa n'ont jamais réussi à immunoprécipiter l'ADN ou l'ARN de cellules HeLa radiomarquées au ³²Phosphate (résultats non

présentés). Par contre, les sérums anti-SS-A(Ro) et anti-Sm immunoprécipitent très bien les ARNs obtenus à partir de ces extraits (Boire et al., 1991). Deuxièmement, aucun des sérums de référence anti-SS-A(Ro), anti-SS-B(La), anti-Sm, anti-U1RNP, anti-Scl-70 et anti-Jo-1 provenant du CDC d'Atlanta n'est arrivé à reconnaître l'antigène Sa en immunobuvardage. Troisièmement, le patron de liaison des anticorps anti-Sa avec le polypeptide obtenu à partir des trois différents tissus est distinct des différents antigènes associés aux RNP. Quatrièmement, contrairement aux sérums anti-Sa, la plupart des sérums décrits ci-haut forment des lignes de précipitations en immunodiffusion sur gel d'agarose avec l'ERH. Cinquièmement, la fréquence des anticorps anti-Sa dans les sérums de patients atteints de PR de même que leur spécificité remarquable pour la maladie ne correspond à aucun de ces systèmes.

3.7 Le système Sa est distinct des autres marqueurs autoimmuns liés à la PR.

Plusieurs expériences ont été réalisées pour caractériser le système Sa/anti-Sa et le distinguer des systèmes immuns décrits antérieurement comme marqueurs dans la PR (Billings et al., 1983; Abe et al., 1988; Westgeest et al., 1989; Hassfeld et al., 1989; McLean et al., 1990; Simon et al., 1993; Schrohenloher et Koopman, 1993). En premier lieu, certaines observations décrites ci-haut ont déjà montré que l'antigène Sa est différent du FR. De plus, la figure 13 présente l'analyse comparative du système Sa avec le FR en immunobuvardage. D'une part, le complexe IgG/anti-IgG (chaîne lourde réduite) possède un poids moléculaire (~55 kD) différent de la bande polypeptidique reconnue par les anticorps anti-Sa (Figure 13). D'autre part, le sérum d'un patient négatif pour le FR détecte spécifiquement la bande de 50 kD associée à l'antigène Sa (Figure 13, ligne 2), tandis qu'aucune bande polypeptidique, incluant l'antigène Sa, n'est reconnue par un sérum lupique ayant un haut titre de FR (Figure 13, ligne 3). Deuxièmement, les systèmes Sa et RA33 ont

été comparés à l'aide de sérums spécifiques de même que de sources antigéniques propres à chacun des systèmes (Figure 14A et B). Deux des 5 sérums anti-RA33 positifs et un des 5 sérums anti-RA33 négatifs reconnaissent spécifiquement la bande de 50 kD liée au Sa (Figure 14A). De façon similaire, les 5 sérums anti-Sa positifs de même que les 5 sérums anti-Sa négatifs provenant de patients rhumatoïdes, testés dans notre laboratoire et celui du Dr Smolen, ont tous été négatifs pour les anticorps anti-RA33 (Figure 14B). Troisièmement, le sérum de référence pour le FAP n'a reconnu aucune bande en immunobuvardage à l'aide de l'ERH et de l'EPH. Le FAP a été identifié en immunofluorescence indirecte, à l'aide de cellules de la muqueuse buccale humaine, dans 7 des 10 sérums anti-Sa positifs de même que dans 2 des 4 sérums rhumatoïdes anti-Sa négatifs. À l'intérieur d'un échange d'échantillons sériques (Sherbrooke-Nantes), 50 sérums de patients (31 PR, 10 LED et 9 arthroses) de spécificité connue ont été testés pour la présence du FAP et des anticorps anti-filaggrine. Des 31 sérums rhumatoïdes, 15 étaient anti-Sa positifs et 16 anti-Sa négatifs. Le FAP a été détecté dans 23/31 sérums de PR (14/23 anti-Sa positifs), dans 3/10 sérums lupiques et dans 3/9 sérums provenant de patients atteints d'arthrose (tous anti-Sa négatifs). Un sérum anti-Sa positif s'est révélé négatif pour le FAP. Les anticorps anti-filaggrine ont été identifiés dans 14/31 sérums de PR (9 des 15 anti-Sa positifs et 5 des 16 anti-Sa négatifs), 2/9 sérums d'arthroses et dans aucun des 10 sérums lupiques. Les anticorps anti-Sa ont aussi été testés dans 73 sérums de PR provenant de Nantes, et 25 d'entre eux se sont révélés positifs pour l'antigène Sa. De plus, des anticorps anti-Sa purifiés par affinité ont été analysés en IFI sur des coupes d'œsophage de rat et sur des préparations de cellules de la muqueuse buccale humaine afin d'identifier un lien entre les anti-Sa et les anticorps anti-kératine (AKA) ou le FAP, respectivement. Aucun signal spécifique n'a pu être détecté suite à l'incubation des anticorps anti-Sa purifiés sur ces deux substrats. Combinés, ces résultats suggèrent que le FAP, les

anticorps anti-filaggrine et les anticorps anti-Sa sont des systèmes distincts pouvant être présents de façon simultanée dans les sérums de patients atteints de PR. Quatrièmement, les anticorps anti-HaT-1 produisent des lignes de précipitation en immunodiffusion et semblent reconnaître un antigène de 150 kD extrait du foie humain (Abe et al., 1988). Par contre, les anticorps anti-Sa ne forment aucune bande de précipitation en immunodiffusion avec l'ERH et l'EPH (résultats non présentés). Malgré la caractérisation insuffisante du système HaT-1, il ne semble pas y avoir de similarité entre le Sa et l'antigène HaT-1. Cinquièmement, plusieurs observations appuient une différence antigénique entre la protéine Sa et les antigènes nucléaires codés par EBV. Le poids moléculaire de l'antigène Sa en SDS-PAGE (50 kD) est clairement différent de ceux des ANEB-1 et -2 (~75 kD). En immunobuvardage, deux sérums rhumatoïdes anti-Sa positifs détectent simultanément la bande de 50 kD (Sa) de l'ERH et les bandes ANEB-1 et -2 des extraits de cellules BL41 infectées par EBV (Figure 15, lignes 3 et 4). Toutefois, un sérum de patient atteint de mononucléose infectieuse positif pour ANEB-1 et -2 ne détecte pas la bande de 50 kD associée à l'antigène Sa dans l'ERH (Figure 15, ligne 5). Sans aucun rapport évident, ce dernier sérum reconnaît une bande d'environ 55 kD dans l'ERH, les extraits de cellules EBV⁺, de même que dans l'extrait de cellules BL41 non infectées. De plus, 10 sérums ANEB positifs provenant de patients souffrant de mononucléose infectieuse ont été testés en immunobuvardage et aucun n'a détecté l'antigène Sa (résultats non présentés). De façon encore plus évidente, les anticorps anti-Sa purifiés par affinité reconnaissent fortement la bande de 50 kD (Sa) dans l'ERH, mais ne détectent aucune bande polypeptidique dans les deux extraits de cellules infectées (Figure 15, ligne 9). Bien que les anticorps anti-ANEB soient présents dans les sérums rhumatoïdes, les anti-Sa constituent une population d'anticorps distincts de ceux dirigés contre des protéines codées par EBV. Sixièmement, le système anti-Sa n'est pas associé aux anticorps dirigés contre les

composantes du cartilage articulaire (Figure 16). Les sérums anti-Sa positifs ne reconnaissent aucune bande spécifique lorsqu'ils sont incubés avec des extraits purifiés de cartilage articulaire canin et humain (Figure 16B et C, ligne b). Le sérum polyclonal de lapin dirigé contre les collagènes articulaires détecte trois bandes polypeptidiques (~55, 70 et 95 kD), avec un patron de liaison de même que des poids moléculaires différents de l'antigène Sa (Figure 16C, ligne d). Ce même sérum anti-collagènes ne reconnaît aucune bande polypeptidique au niveau de l'EPH riche en antigène Sa (Figure 16D, ligne d). Septièmement, des expériences en immunobuvardage ont été effectuées afin de vérifier si les HSPs mycobactériennes et humaines possèdent une relation immunochimique avec l'antigène Sa (Tableau 1). Dans un premier temps, des anticorps monoclonaux anti-HSPs de même qu'un sérum polyclonal dirigé contre la HSP de 60 kD humaine ont reconnu spécifiquement les différentes protéines de stress (60, 65 et/ou 70 kD) dans des extraits bruts de mycobactéries, des extraits purs de HSP, de même que dans l'ERH. Toutefois, ces anticorps anti-HSP n'ont démontrés aucune réactivité contre l'antigène Sa de 50 kD en immunobuvardage (Tableau 1). De plus, en utilisant quatre sources antigéniques de HSPs humaines ou mycobactériennes, aucune réactivité n'a pu être démontrée par l'incubation de sérums anti-Sa ou d'anticorps anti-Sa purifiés par affinité (Tableau 1). Malgré la présence de HSP dans l'extrait de rate riche en antigène Sa, ces expériences ont démontrées clairement que les anticorps anti-Sa détectent une protéine distincte des HSP mycobactériennes et humaines.

3.8 Caractérisation de l'autoantigène Sa. Les extraits de rate et de placenta humains ont été traités par différents enzymes afin de caractériser l'antigène Sa du point de vue biochimique. Les résultats de ces expériences démontrent que les traitements à la RNase A, à la DNase I et à la neuraminidase de *Vibrio cholerae*

n'ont aucun effet sur la taille des bandes polypeptidiques ou sur l'antigénicité de l'antigène Sa. Par contre, le traitement à la protéinase K détruit complètement son antigénicité (résultats non présentés). Il est toutefois possible que les résidus d'acide sialique en position terminal n'aient pas été complètement éliminés due à une digestion non spécifique à la neuraminidase. Des méthodes alternatives pour détecter les glycoprotéines, tels que la coloration spécifique du gel d'acrylamide au PAS ou les techniques indirectes utilisant les lectines, pourront être utilisées ultérieurement. La combinaison de ces derniers résultats avec l'incapacité des anticorps anti-Sa à immunoprécipiter l'ARN ou l'ADN provenant d'extraits de cellules HeLa suggère que l'antigène Sa est une protéine non sialylée et non associée aux acides nucléiques. De plus, les sérums anti-Sa ne reconnaissent aucune bande polypeptidique spécifique en immunobuvardage, lorsqu'incubés avec les fractions cytoplasmiques ou nucléaires de cellules HeLa et MOLT 4 de même qu'avec un extrait brut de cellules fibroblastiques (3T3) de souris. Également, les anticorps anti-Sa n'ont pas immunoprécipité la protéine Sa à partir d'extraits de cellules HeLa radiomarquées au ^{35}S . Les expériences d'IFI sur des cellules et lignées cellulaires diverses, effectuées à l'aide de sérums anti-Sa, d'IgG purifiées et d'anticorps anti-Sa purifiés par affinité, n'ont pas révélé de patron de liaison évident. En utilisant les techniques d'immunobuvardage et d'immunofluorescence, il n'a pas été possible de détecter significativement l'antigène Sa dans des cellules en culture.

Une expérience de réactivité croisée, entre l'extrait de placenta humain et un extrait de placenta bovin (EPB), a été réalisée afin de vérifier la spécificité d'espèce de l'antigène Sa (Figure 17). Le sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) révèle les deux systèmes sur l'EPH (Figure 17A, ligne 2), tandis que seules les bandes polypeptidiques associées au La sont identifiées dans l'EPB (Figure 17B, ligne 2). Le sérum rhumatoïde anti-Sa positif détecte fortement les bandes

polypeptidiques du Sa dans l'EPH (Figure 17A, ligne 3). Ce même sérum réagit avec des bandes polypeptidiques apparentées à l'antigène Sa dans l'EPB (Figure 17B, ligne 3). Le patron de liaison des anticorps anti-Sa est toutefois moins bien défini. En respectant les concentrations protéiques des deux extraits, les anticorps anti-Sa purifiés par affinité à partir de la membrane contenant l'EPH détectent avec beaucoup moins d'intensité le triplet polypeptidique du Sa bovin par rapport à l'antigène humain (Figure 17A et B, ligne 4). Ces résultats montrent que les tissus provenant d'autres espèces possèdent une réactivité croisée plus faible avec l'antigène Sa de nature humaine.

3.9 Purification de l'antigène Sa placentaire. L'absence de la protéine Sa dans des cellules ou des lignées cellulaires oblige la purification de la protéine à partir de tissus humains afin de caractériser l'antigène Sa. Certaines observations ont démontré que l'antigène Sa était difficilement isolable à partir de rates humaines: un rendement élevé d'isolement de l'antigène Sa n'a été obtenu que chez environ 30% des rates utilisées; le niveau d'expression semble être différent d'un individu à l'autre; la fraîcheur du tissu peut varier entre chacune des autopsies; et la cause de décès peut affecter les caractéristiques de l'antigène. Pour ces raisons et parce que les placentas humains sont plus homogènes et plus facilement accessibles que les rates, l'EPH a été ultérieurement purifié par chromatographie d'échange d'ions sur gradient de NaCl (Figure 18A). Le profil chromatographique révèle plusieurs pics majeurs tout au long du gradient de 120 à 300 mM NaCl. L'analyse en ELISA des différentes fractions à l'aide de sérums anti-Sa positifs dilués 1/2000, révèle que l'antigène Sa élué entre 210 et 240 mM de NaCl (Figure 18A, pointillés rouges). Les fractions se situant entre 25 et 29 possèdent un maximum de détection de l'antigène Sa, avec une D.O._{450nm} obtenue entre 0.2 et 0.4. De façon similaire, lorsque les fractions sont combinées par 3 puis analysées en immunobuvardage, l'antigène Sa

est détectable dans la même région du profil chromatographique (Figure 18B, lignes 8, 9 et 10). La concentration optimale de l'antigène se situe dans les fractions 25 à 27 inclusivement.

3.10 Microséquençage des bandes polypeptidiques associées à l'antigène Sa. Les fractions riches en Sa obtenues par chromatographie selon la figure 18 (i.e. 25 à 27 inclusivement) ont été combinées et analysées en SDS-PAGE et en immunobuvardage avec des conditions particulières favorisant une meilleure résolution des bandes (gel plus long et voltage plus faible) (Figure 19). L'incubation d'un sérum rhumatoïde anti-Sa reconnaît les trois bandes polypeptidiques majeures associées à l'antigène Sa (Figure 19A). La coloration à l'argent du gel contenant ces fractions protéiques démontre plusieurs bandes polypeptidiques de faibles poids moléculaires principalement (Figure 19B). Les bandes immunoréactives semblent correspondre à des bandes polypeptidiques uniques se localisant dans la même région.

De façon remarquable, lorsque les anticorps dirigés contre les bandes 1, 2 ou 3 sont purifiés par affinité puis réincubés avec la même source antigénique, les anticorps individuels (anti-53, -50 ou -49 kD) reconnaissent toujours le même triplet polypeptidique. Cette réactivité croisée suggèrent que les trois bandes polypeptidiques sont des produits de dégradation et semblent provenir de la même protéine.

L'analyse de la séquence peptidique en N-terminal de chacune des bandes polypeptidiques transférées sur PVDF révèle une similarité avec deux protéines différentes (Tableau 2). Lorsque la séquence obtenue à partir de la bande 1 (53 kD) est comparé dans les banques de protéines, elle est entièrement identique (sur 20

positions comparées) à la sous-unité β de la prolyl 4-hydroxylase ou la protéine disulfure isomérase (PDI). Cette séquence a été obtenue durant 20 cycles de dégradation et avec un rendement initial estimé à 40.0 pmol. De façon intéressante, les séquences obtenues à partir des bandes 2 et 3 (50 et 49 kD) sont étroitement apparentées. Lorsque comparées aux banques peptidiques, les deux bandes semblent similaires (62.5%) à la vimentine humaine. Les séquences des bandes 2 et 3 ont été obtenues durant 10–15 cycles de dégradation et avec des rendements se situant au niveau de 10–20 pmol. Bien que les trois bandes polypeptidiques associées au Sa semblent être identiques du point de vue de leur immunoréactivité, les séquences en N-terminal obtenues ne confirment pas cette observation.

3.11 Analyse de la réactivité des anticorps anti-Sa avec la vimentine. Dans un premier temps, les anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre la vimentine ont été testés en immunobuvardage sur l'EPH et la vimentine purifiée à partir du cristallin de boeuf. Ces deux sources d'anticorps anti-vimentine ont détectés de multiples bandes polypeptidiques variants entre 50 et 30 kD, incluant le triplet associé à l'antigène Sa, à la suite de leurs incubation avec l'EPH, tandis qu'ils ont détectés spécifiquement une bande d'environ 50 kD sur la vimentine bovine purifiée (résultats non présentés). Dans le but de confirmer ou de réfuter l'association possible entre l'antigène Sa et la vimentine, des expériences de réactivité croisée entre les deux systèmes ont été effectuées. Premièrement, des sérums rhumatoïdes anti-Sa positifs et des témoins ont été testés en parallèle par immunobuvardage sur l'EPH et sur de la vimentine bovine purifiée (Figure 20A et B). Certains sérums anti-Sa détectent simultanément la bande de 50 kD associée à la vimentine (Figure 20A et B, lignes 2, 5 et 8). Toutefois, d'autres sérums anti-Sa fortement positifs ne reconnaissent pas la bande polypeptidique de la vimentine (Figure 20A et B, lignes 3, 4, 7 et 12). Deuxièmement, des protocoles d'absorption avec l'EPH ou avec de la

vimentine purifiée ont été effectués sur des sérums reconnaissant les deux systèmes antigéniques. Le sérum anti-Sa non absorbé reconnaît les bandes polypeptidiques associées à l'antigène Sa de même que la bande de 50 kD de la vimentine (Figure 21, ligne 1). L'absorption du sérum avec 5 mg d'EPH inhibe quasi totalement les réactivités anti-Sa et anti-vimentine (Figure 21, ligne 2). Par contre, les absorptions avec 5 et 10 mg de vimentine purifiée ne réduit aucunement la réactivité anti-Sa et inhibe complètement la réactivité contre la vimentine (Figure 21, lignes 3 et 4). Un protocole d'absorption similaire a été effectué à l'aide de filaments intermédiaires isolés à partir de cellules HeLa de même que de cellules Pt K2 riches en FI. Des résultats identiques à ceux décrit ici ont été obtenus par l'absorption de sérums anti-Sa avec les FI isolés de cellules HeLa ou Pt K2 (résultats non présentés). Malgré la séquence peptidique apparentée entre l'antigène Sa et la vimentine, l'immunoréactivité observée à l'aide des sérums de patients n'est pas comparable. Toutefois, les deux populations d'anticorps (anti-Sa et anti-vimentine) peuvent être présentes de façon simultanée.

3.12 Isolement de l'ADNc codant pour la PDI. L'ADNc de la PDI a été isolé en utilisant la technique de PCR à l'aide d'amorces synthétiques au niveau des extrémités 5' et 3' de la séquence connue. Le fragment d'ADNc obtenu par PCR correspond à la taille de la pleine longueur de la PDI, soit 1540 pb (Figure 22A). Ce fragment a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pUC19. En raison de la séquence et de la cartographie des sites de restriction de la PDI déjà déterminées, l'insert a été confirmé et analysé via les sites de restriction Pvu II (Figure 22B et C). Lorsque le plasmide PDI/pUC19 est digéré par Bam HI, les fragments de 2686 pb (pUC19) et de 1540 pb (ADNc de la PDI) sont observés en gel d'agarose (Figure 22C, ligne 2). La digestion simultanée par Bam HI et Pvu II confirme en partie la séquence de la PDI, résultant en 7 fragments correspondant aux tailles estimées selon la

cartographie de l'ADNc (Figure 22C, ligne 3). De plus, le séquençage nucléotidique de l'insert (environ 200 nucléotides de chaque extrémité) a confirmé que le fragment correspondait à la PDI humaine (résultats non présentés).

3.13 Expression de l'ADNc codant pour la PDI, purification des protéines de fusion et recombinante et détection des anticorps anti-PDI dans les sérums de patients. L'ADNc de la PDI a été sous-cloné au site BamHI du vecteur d'expression pGEX-KG afin d'induire la synthèse de la protéine recombinante dans le cadre de lecture approprié (Figure 23). L'analyse de l'orientation de l'insert a été confirmée par la digestion avec Pst I (Figure 23A). Lorsque le plasmide PDI/pGEX-KG est digéré par Bam HI, un fragment de 5000 pb correspondant au vecteur et un fragment de 1540 pb correspondant à l'ADNc de la PDI sont obtenus en gel d'agarose (Figure 23B, ligne 2). À la suite de la digestion par Pst I, deux fragments (4471 et 2069 pb) confirment la bonne orientation de l'insert afin de permettre l'expression de la protéine recombinante respective (Figure 23B, ligne 3).

La protéine de fusion GST-PDI exprimée dans *E. coli* PR745 *lon*⁻ a été purifiée par affinité, clivée de la protéine porteuse (GST) et identifiée sur gel de polyacrylamide (Figure 24A). La GST-PDI induite possède le poids moléculaire estimé à environ 84 kD (PDI-57 kD + GST-27 kD) (Figure 24A, lignes 2, 3 et 4). Une bande polypeptidique majeure est obtenue une fois la GST-PDI purifiée sur Sépharose 4B couplée à la glutathione (Figure 24A, ligne 4). Le clivage de la protéine recombinante à l'aide de la thrombine libère la PDIr de sa protéine porteuse (GST) et résulte en une bande polypeptidique d'environ 57 kD. Ce poids moléculaire correspond à la taille attendue de la PDIr. Afin de déterminer si la réactivité anti-Sa est dirigée plus particulièrement contre la PDIr, des sérums provenant de patients et de témoins ont été analysés en immunobuvardage avec la PDIr (Figure 24B).

Malgré la réactivité significative de sérums de PR (Figure 24B, lignes 1, 3 et 4), les sérums de patients atteints d'arthrose anti-Sa négatifs reconnaissent fortement la protéine recombinante (Figure 24, lignes 6, 7 et 9). D'autres analyses en immunobuvardage ont démontré une réactivité anti-PDI dans plusieurs sérums de patients atteints de diverses maladies rhumatismales, telles que des LED, arthrites psoriasiques, ostéoporoses et arthroses. Ces résultats suggèrent que l'autoantigène Sa et la PDI sont différents du point de vue immunochimique. En dépit de sa non-spécificité, la PDI semble toutefois être reconnue comme autoantigénique par les sérums de patients atteints de différentes maladies rhumatismales.

Des protocoles d'absorption ont été réalisés afin de confirmer la dissociation du point de vue immunochimique entre l'antigène Sa et la PDI (Figure 25). Un sérum reconnaissant les deux systèmes a été sélectionné et absorbé ou non avec deux concentrations d'EPH semi-purifié ou de GST-PDI purifiée sur colonne de Glutathione Sépharose. L'absorption du sérum avec l'EPH inhibe totalement sa réactivité avec les bandes polypeptidiques associées à l'antigène Sa (Figure 25A, lignes 2 et 3); mais n'affecte en aucun cas sa réactivité avec la GST-PDI (Figure 25B, lignes 2 et 3). Inversement, l'absorption du sérum avec la GST-PDI n'inhibe pas la reconnaissance de l'antigène Sa (Figure 25B, lignes 4 et 5), mais bloque complètement la réactivité anti-PDI (Figure 25B, lignes 4 et 5). L'absence de réactivité croisée suggère que l'antigène Sa est distinct de la PDI recombinante.

3.14 Sensibilité et spécificité des autoanticorps anti-Sa dans la PR. Des échantillons sériques de 206 patients atteints de PR classique et de 276 témoins ont été analysés en immunobuvardage pour la présence d'anticorps dirigés contre la protéine de 50 kD. De façon remarquable, les 91 sérums anti-Sa positifs (incluant le sérum Sa original) proviennent presque tous de patients souffrant de PR (Tableau 3).

Ce tableau montre que la présence d'anticorps anti-Sa est particulièrement spécifique pour la maladie. Dans le groupe de 206 patients rhumatoïdes, la sensibilité des anticorps anti-Sa (88/206) est d'environ 43% (Tableau 3). Par contre, les anticorps anti-Sa n'ont été détectés que chez 3 des 276 patients non rhumatoïdes. De ces 3 patients, 2 ont été inclus dans le groupe des collagénoses non différenciées: un patient était atteint d'une polyarthrite non érosive et l'autre atteint d'une polyarthrite associée à un cancer du colon. En ce qui concerne le sérum inclus dans le groupe des polyarthrites réactives/séronégatives, le patient souffrait d'une polyarthrite séronégative avec psoriasis.

Les anticorps anti-Sa sont parfois détectés au tout début de la maladie et leur présence semble être indépendante du FR (Tableau 4). Lorsque les patients rhumatoïdes sont subdivisés en sous-groupes (FR positif ou négatif), les anticorps anti-Sa sont détectés dans 71/143 (50%) des patients FR positif et dans 17/63 (27%) des patients FR négatifs. De plus, les anticorps anti-Sa n'ont pas été retrouvés dans les sérums de 39 patients atteints de collagénoses non rhumatoïdes et positifs pour le FR. De façon intéressante, les anticorps anti-Sa sont également détectables chez 9/31 (29%) des patients testés au début des manifestations de la PR (Tableau 4). Une de ces patientes a été analysée avec des prélèvements sérologiques sériés tout au cours de l'évolution de la maladie (Figure 26). En 1985-86, la patiente présentait des symptômes non associés à la PR. Les manifestations articulaires érosives n'ont été identifiées qu'en 1987 avec un titre important des anticorps anti-Sa (Figure 26, ligne 3). À partir de ce moment, la maladie articulaire a été contrôlée à l'aide de méthotrexate et de corticostéroïdes et le titre des anticorps a chuté progressivement (Figure 26, lignes 4 à 7) et est devenu pratiquement non détectable au cours des années suivantes (Figure 26, lignes 8 à 12). Bien que cette démonstration soit

unique, plusieurs autres observations ponctuelles suggèrent que les autoanticorps anti-Sa varient avec l'activité de la PR.

En plus d'une sensibilité intéressante (43%), les anticorps anti-Sa sont extrêmement spécifiques pour la PR (Tableau 5). L'analyse de ce marqueur dans les 482 sérums de patients testés en immunobuvardage montre que les anti-Sa sont spécifiques à 98,9% pour la PR, comparativement à 76,9% pour le FR (valeur qui est appuyée par de nombreuses autres études). Également, la valeur prédictive positive du marqueur anti-Sa est de loin plus élevée (96,7%) que celle du FR (78,6%), mais avec des valeurs prédictives négatives égales. Jusqu'à présent, aucun sérum positif n'a été identifié chez des individus normaux de même que chez des patients souffrant de maladies rhumatismales de nature non autoimmune.

3.15 Isolement du clone d'ADNc par immunocriblage de la bibliothèque d'expression avec des sérums de patients rhumatoïdes. Environ 2.5×10^6 clones d'ADNc dans λ gt11 ont été criblés avec un pool de sérums de patients atteints de PR érosive (Figure 3). Un clone positif (RA-1) a été identifié et caractérisé ultérieurement. Après purification successive, la protéine de fusion codée par le clone RA-1 (β -gal-RA-1) est fortement immunoréactive avec le pool de sérums rhumatoïdes (Figure 27A). Cette étape secondaire de la purification montre non seulement que les anticorps reconnaissent spécifiquement le clone RA-1, mais qu'ils ne réagissent pas avec les phages négatifs présents à cette étape de purification du phage. Une fois le λ gt11 pur, l'insert d'ADNc codant pour RA-1 a été isolé et analysé sur gel d'agarose. Le fragment d'ADNc possède une taille d'environ 950 pb (Figure 27B). À cette étape, des sérums individuels ont été testés pour leur réactivité avec la β -gal-RA-1 exprimée à la suite de l'induction par l'IPTG du clone λ gt11 pur. Trois des cinq sérums de PR ont reconnu spécifiquement les plages

positives, tandis qu'aucune réactivité n'a été obtenue avec cinq sérums témoins non rhumatoïdes (résultats non présentés).

3.16 Séquençage de l'ADNc codant pour le clone RA-1. L'insert d'ADNc isolé à partir du λ gt11 positif a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pUC19 puis séquencé. La séquence du clone RA-1 de 950 pb a été analysée dans la banque de gènes informatisée (*NCBI/BLAST network service*) et code pour un polypeptide de 284 acides aminés (Figure 28). L'analyse de l'homologie de séquence à travers la banque de donnée *GenBank/EMBL* résulte en une identité quasi complète avec la séquence nucléotidique (positions 1435 à 2384) et la séquence peptidique (positions 425 à 708) de la portion COOH-terminale de la calpastatine du foie humain (No. d'accension M86258, séquence totale: 2493 pb et 708 résidus d'acides aminés). Quelques différences mineures ont été observées au niveau de la séquence. Premièrement, l'homologie de la séquence nucléotidique avec la calpastatine humaine se termine à la position 2384, 95 pb en aval du codon de terminaison de la traduction (TAA: codon stop) aux positions 2287-2289. Par contre, la séquence publiée se termine 204 nucléotides après le codon stop (Asada et al., 1989). Toutefois, cette différence n'affecte en aucun cas l'homologie et la séquence peptidique puisqu'il s'agit d'une région non codante du clone. Deuxièmement, une substitution nucléotidique (G \rightarrow A) à la position 1937 du clone RA-1 représente la seule différence nucléotidique entre le clone RA-1 et la séquence correspondant aux domaines 3 et 4 de la calpastatine humaine (Figure 28). Cette substitution résulte également en remplacement du résidu glycine par le glutamate à la position 592 de la séquence peptidique. Par contre, les séquences peptidiques de la calpastatine de porc et de lapin possèdent également un résidu glutamate à cette même position lorsqu'elles sont comparées à la séquence de la calpastatine humaine (Asada et al., 1989). Cette substitution se situe dans une région hautement conservée de la

molécule et suggère la possibilité qu'une erreur se soit glissée au niveau de la séquence nucléotidique de la calpastatine du foie humain.

La séquence de 708 acides aminés de la calpastatine humaine est subdivisée en 5 domaines (L, 1, 2, 3 et 4), dont 4 domaines en COOH-terminal associés à l'activité inhibitrice de la protéine (Figure 29). Le clone RA-1 code pour 284 résidus d'acides aminés en COOH-terminal du polypeptide et correspond à environ 40% de la molécule. Ce polypeptide se rapporte aux domaines 3 et 4, qui possèdent tous deux la séquence consensus associée à l'activité inhibitrice de la calpastatine (Figure 29).

3.17 Expression de l'ADNc RA-1 et purification des protéines de fusion et recombinante. L'ADNc du clone RA-1 a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pGEX-4T-1 afin d'induire la synthèse de la protéine recombinante (Figure 30A). Le vecteur pGEX-4T-1 choisi possède le cadre de lecture approprié pour l'expression d'ADNc isolés du site EcoRI de λ gt11. L'insertion et l'orientation du fragment RA-1 ont été vérifiées par la digestion avec EcoRI et Pst I respectivement (Figure 30A et B). L'analyse sur gel d'agarose des fragments obtenus par digestion avec EcoRI confirme la ligation de l'ADNc de 950 pb dans le vecteur (Figure 30B, ligne 1), tandis que celle effectuée avec Pst I confirme l'orientation de l'insert dans le sens approprié pour l'expression de la protéine recombinante (Figure 30B, ligne 2).

La protéine de fusion GST-RA-1 exprimée dans *E. coli* PR745 *lon*⁻ a été purifiée par affinité, clivée de la protéine porteuse GST et identifiée par SDS-PAGE et par immunobuvardage avec le mélange de sérums de PR utilisé pour le criblage de la bibliothèque (Figure 31). À la suite de l'induction par l'IPTG, la GST-RA-1 exprimée possède le poids moléculaire estimé de 65 kD (Figure 31A, ligne 2). Deux

bandes polypeptidiques majeures ont été purifiées par affinité sur colonne de Glutathione Sépharose, en utilisant un lysat de bactéries transformées avec pGEX-4T-1/RA-1 et induites avec l'IPTG (Figure 31A, ligne 5). En immunobuvardage, la bande supérieure est fortement reconnue par le mélange de sérums rhumatoïdes (Figure 31B, ligne 5). Certaines bandes de plus faible poids moléculaire sont aussi reconnues par le mélange de sérums et semblent représenter des produits de dégradation de la protéine de fusion. De plus, une bande de 65 kD est reconnue tant au niveau des bactéries transformées non induites (Figure 31B, ligne 1) qu'au niveau des bactéries transformées avec pGEX-4T-1 seul, induites ou non (Figure 31B, lignes 3 et 4). Cette bande polypeptidique représente nécessairement une protéine bactérienne, d'une part, puisqu'elle n'est pas subséquentement purifiée par affinité sur la colonne de Glutathione Sépharose (Figure 31A et B, ligne 6) et d'autre part, puisqu'elle est éliminée lorsque les anticorps naturels sont absorbés avec des protéines bactériennes (résultats non présentés). Le clivage de la RA-1r de sa protéine porteuse GST par la thrombine produit deux bandes antigéniques possédant des poids moléculaires apparents de 43 et 47 kD. Le poids moléculaire de la RA-1r est toutefois estimé à 36 kD. Le mélange de sérums rhumatoïdes reconnaît fortement les deux bandes polypeptidiques associées à la RA-1r (Figure 31B, ligne 7). Dans certaines préparations (telles que celle-ci), la réaction de clivage par la thrombine donne des bandes polypeptidiques additionnelles (Figure 31A, ligne 7). Ces bandes ne sont toutefois pas reconnues par le mélange sérique de même que par deux sérums provenant du mélange testés individuellement (Figure 32B, lignes 1 et 2).

En utilisant la préparation purifiée de RA-1r, deux bandes polypeptidiques n'ayant pas rapport à la protéine recombinante peuvent être reconnues par certains sérums. La première bande possède un poids moléculaire apparent de 40 kD et se situe juste

sous les deux bandes associées à la RA-1r en immunobuvardage (Figure 32B). La détection de cette bande polypeptidique semble toutefois être indépendante de la reconnaissance des deux bandes associées à la RA-1r. Tel que la figure 32B le démontre, le sérum incubé à la ligne 1 ne détecte pas cette bande inférieure, les sérums dans les lignes 6 à 9 reconnaissent les trois bandes, tandis que le sérum à la ligne 10, considéré anti-RA-1 négatif, ne reconnaît que la bande de 40 kD. De plus, le même sérum incubé à la ligne 10 ne détecte aucunement la GST-RA-1 (Figure 32B, ligne 10). Ce patron de reconnaissance suggère donc que la bande de 40 kD n'est pas associée à la RA-1r. La deuxième bande polypeptidique identifiée par certains sérums possède un poids moléculaire d'environ 75 kD (Figure 31B, ligne 7). Cette bande est vraisemblablement une protéine de *E. coli* produite par le gène *dnaK* qui co-purifie avec la protéine recombinante (Sherman et Goldberg, 1992) et qui est reconnue par les anticorps naturels de sérums non absorbés. En fait, cette réactivité dirigée contre la bande de 75 kD a été totalement éliminée par l'absorption de sérums avec un lysat de *E. coli* (résultats non présentés). Finalement, le mélange sérique ne détecte aucune bande avec la GST purifiée (Figure 31B, ligne 6) ou avec les réactifs du clivage témoin (i.e. sans la protéine recombinante) (Figure 31B, ligne 8). L'ensemble de ces résultats montre une réactivité importante des sérums rhumatoïdes contre la RA-1r, sans aucune détection de la portion GST.

3.18 Détection des anticorps dirigés contre la RA-1 de fusion et recombinante dans les sérums de patients rhumatoïdes et de témoins. Des immunobuvardages avec la GST-RA-1 et la RA-1r ont été effectués afin d'évaluer la réactivité de 97 sérums individuels contre le polypeptide RA-1 (Tableau 6 et Figure 32). Une réactivité contre des bandes polypeptidiques bactériennes, de poids moléculaires inférieurs à la protéine de fusion, a toutefois été observée lorsque les sérums ont été testés avec la GST-RA-1 (Figure 32A). Les résultats obtenus avec la GST-RA-1

sont similaires à ceux obtenus avec la RA-1r. Les deux bandes polypeptidiques associées à la RA-1r ont été reconnues par 21 des 44 (45.5%) sérums de PR, 2 des 43 (4.7%) sérums provenant de patients non-rhumatoïdes et aucun des 10 sérums normaux (Tableau 6). Les 2 sérums non rhumatoïdes proviennent de patients atteints d'arthrose. Ces résultats démontrent que les patients atteints de maladies rhumatismales produisent des autoanticorps circulants dirigés spécifiquement contre un polypeptide associé à deux domaines fonctionnels de la calpastatine humaine. Ces données suggèrent également que les anticorps anti-calpastatine sont préférentiellement associés à la PR.

3.19 *L'antigène Sa versus la calpastatine.* Malgré l'absence de données définitives démontrant un lien immuno-moléculaire entre les deux systèmes, des expériences et des analyses comparatives ont été réalisées. Du fait que la fréquence des anticorps anti-RA-1r (45.5% des PR et 3.8% des témoins) est relativement similaire à celle obtenue avec les anticorps anti-Sa dans les PR (42.7%) et dans les témoins (1.3%), les 97 sérums analysés avec la RA-1r ont aussi été testés en immunobuvardage pour leur réactivité contre le polypeptide Sa isolé du placenta humain (Tableau 7). La corrélation entre le système Sa et la calpastatine suggère que les deux antigènes semblent distincts et qu'ils peuvent être reconnu soit par deux sous populations d'anticorps, soit par des anticorps reconnaissant des déterminants antigéniques communs entre les deux protéines. Au total, 31 sérums de PR étaient concordants (18 positifs pour les deux systèmes et 13 négatifs pour les deux systèmes) et 13 étaient discordants (3 uniquement positifs pour la RA-1 et 10 uniquement positifs pour le Sa). Les 53 sérums témoins provenant de patients et de normaux ont tous été anti-Sa négatifs, tandis que deux ont été anti-RA-1 positifs.

Des absorptions de sérums ont été effectuées dans le but d'analyser la relation antigénique possible entre l'autoantigène Sa de l'EPH et le polypeptide RA-1 isolé de la bibliothèque d'expression d'ADNc de placenta humain (Figures 33 et 34). Des sérums positifs pour les deux systèmes ont été sélectionnés, absorbés ou non avec les sources antigéniques respectives et testés en immunobuvardage avec l'EPH. Un sérum non absorbé, traité dans les mêmes conditions qu'un sérum absorbé mais sans source antigénique, reconnaît le triplet polypeptidique associé à l'antigène Sa placentaire (Figure 33A, ligne 1). L'intensité du signal obtenu par ce sérum a été considéré comme 100% de la réactivité anti-Sa en analyse d'image (Figure 33B, ligne 1). La réactivité contre les trois bandes polypeptidiques a été totalement abolie par l'absorption du sérum avec 5 et 10 mg d'EPH semi-purifié (Figure 33A et B, lignes 2 et 3). Lorsque ce même sérum a été absorbé avec 100 et 200 µg de RA-1r, la réactivité anti-Sa est réduite de 50 à 70% (Figure 33A et B, lignes 4 et 5). Étrangement, cette réactivité n'est pas réduite de façon dose dépendante selon la quantité de protéine recombinante utilisée pour l'absorption. De plus, la reconnaissance de l'antigène Sa est réduite de plus de 70% par l'absorption avec 1 mg de GST-RA-1 (Figure 33A et B, ligne 6). L'absorption d'un second sérum rhumatoïde révèle des résultats similaires avec une inhibition de plus de 90% de la réactivité contre le polypeptide Sa (Figure 34A et B). Contrairement aux observations effectuées avec le sérum de la figure 33, les résultats obtenus par l'absorption de ce sérum avec la RA-1r révèlent une inhibition dose dépendante (Figure 34A et B, lignes 4 et 5). De façon intéressante, l'absorption de la réactivité des trois bandes polypeptidiques, soit avec la GST-RA-1 ou la RA-1r, semble être non proportionnelle (Figures 33 et 34, lignes 4, 5 et 6). Ce taux d'élimination de réactivité anti-Sa peut être expliqué soit par un partage antigénique uniquement entre les deux bandes inférieures (50 et 49 kD) de l'antigène Sa et la RA-1r, soit par l'absence d'une protéine recombinante possédant la pleine longueur de la

calpastatine. Ces résultats préliminaires suggèrent donc un partage de déterminants antigéniques entre les épitopes de l'antigène Sa et ceux de la protéine RA-1r, sans toutefois démontrer une identité entre les deux molécules. Des expériences plus poussées devront toutefois être effectuées dans le but de déterminer l'association définitive entre ces deux systèmes.

DISCUSSION

La polyarthrite rhumatoïde est l'une des arthrites les plus communes chez l'humain et ses manifestations chroniques engendrent des conséquences à long terme chez l'individu affecté par la maladie. La maladie se caractérise particulièrement par une inflammation articulaire, avec des manifestations extra-articulaires englobant plusieurs conditions cliniques diverses. Le syndrome rhumatoïde est reconnu depuis longtemps comme une maladie autoimmune systémique typique. La physiopathologie de la PR est centrée sur des phénomènes dysimmunitaires tant cellulaires qu'humoraux qui aboutissent à une destruction des structures articulaires. Le déclencheur de ces événements est toujours inconnu mais on soupçonne l'implication d'autoanticorps comme le facteur rhumatoïde dans la formation et la déposition de complexes immuns dans l'articulation et possiblement dans le dérèglement de l'homéostasie lymphoïde chez ces patients. Malheureusement, le FR n'est pas un marqueur sérologique très spécifique de la PR. Si un tel marqueur existait, il pourrait possiblement appuyer certaines hypothèses à la base de l'inflammation articulaire rhumatoïde et peut-être même conduire au facteur étiologique de la PR.

Un grand nombre d'études ont été centrées sur l'identification d'autoantigènes ayant des fonctions cellulaires importantes et pouvant induire la production d'autoanticorps particuliers chez les patients atteints de maladies autoimmunes systémiques. Le travail présenté dans notre étude est centré principalement sur la caractérisation de deux nouveaux systèmes autoimmuns spécifiquement associés à la polyarthrite rhumatoïde. Premièrement, le système autoimmun Sa/anti-Sa semble être un candidat potentiel comme marqueur sérologique spécifique pour la maladie. Les autoanticorps anti-Sa sont détectés tant au niveau précoce qu'au cours de l'évolution de la maladie. Deuxièmement, à l'aide de sérums de PR pré-sélectionnés selon des critères stricts de sérologie autoimmune, cette étude décrit l'identification et le

clonage d'un ADNc codant pour une portion de la calpastatine humaine. La calpastatine est l'inhibiteur naturel des calpaïnes, des protéinases à cystéine activées par le Ca^{++} . Les calpaïnes sont impliquées dans la transmission de signaux intracellulaires et de façon intéressante, sont capables de dégrader, voire même détruire, les protéines de la matrice intercellulaire, telles que les composantes articulaires. La protéine recombinante RA-1 correspondant aux domaines 3 et 4 de la calpastatine humaine est détectée spécifiquement par les sérums d'environ 40 à 50% des patients rhumatoïdes. L'immunoréactivité dirigée contre la calpastatine suggère une implication possible des autoanticorps anti-calpastatine dans la pathogénèse de la maladie.

Le système autoimmun Sa/anti-Sa est un marqueur spécifiquement associé à la PR.

Au cours des 20 dernières années, l'identification de nouveaux autoanticorps d'intérêt clinique a permis de développer et de raffiner le diagnostic de même que le suivi de patients souffrant de certaines collagénoses, incluant le LED, le SS, la sclérodermie, la myosite et certaines vasculites, particulièrement la granulomatose de Wegener (Warner, 1994). Par exemple, les sérums de patients atteints de LED possèdent des autoanticorps qui sont cliniquement importants pour le diagnostic et la classification de la maladie (Tan et al., 1982). Ceux-ci incluent des anticorps spécifiquement associés à la maladie, tels que les anti-Sm et les anti-ADN double brin, et des anticorps associés à certaines manifestations cliniques, tels que les anti-SS-A(Ro), les anti-SS-B(La) et les anti-U1 RNP. Comme pour les autres maladies rhumatismales inflammatoires, plusieurs séries d'études ont identifié dans les sérums de patients souffrant de PR certaines populations d'autoanticorps, particulièrement le FR, les anti-collagène de type II, l'anti-HaT-1, les anti-ANEB-1 et -2, les anti-HSP, l'anti-SS-A(Ro), l'anti-RA33, le FAP et l'anti-filaggrine. Le FR, qui, est

jusqu'à maintenant utilisé comme marqueur diagnostique en clinique, est présent dans une multitude de maladies autoimmunes et sa production semble être le résultat d'une réponse secondaire à une stimulation prolongée du système immunitaire. À l'exception des "anticorps anti-kératine" décrits il y a plus de 15 ans (Young et al., 1979) et reconnus actuellement comme des autoanticorps dirigés contre la filaggrine (Simon et al., 1993), aucun des autres systèmes immuns n'a été reconnu comme un stimulus de la réponse immune dans la PR ou comme un marqueur spécifique pour la maladie. En analysant la réactivité de sérums de patients rhumatoïdes avec des extraits de tissus humains en immunobuvardage, nous avons identifié une nouvelle population d'autoanticorps dirigés contre une protéine d'environ 50 kD de poids moléculaire. Les résultats obtenus dans cette étude démontrent que ce nouveau système autoimmun est spécifique pour la PR et possède plusieurs caractéristiques particulières. Ces caractéristiques, détaillées ci-après, peuvent expliquer pourquoi de nombreux travaux antérieurs, orientés sur l'identification de marqueurs sérologiques spécifiques pour la PR, n'auraient pas réussi à identifier l'autoantigène Sa.

Premièrement, la détection initiale des autoanticorps anti-Sa a été strictement effectuée par immunobuvardage. Contrairement à la plupart des systèmes autoimmuns décrits précédemment, les anticorps anti-Sa n'arrivent ni à former de bande de précipitation en immunodiffusion sur gel d'agarose, ni à produire de patron d'immunofluorescence définitif. Toutefois, nous avons obtenus des résultats ambigus démontrant un marquage au niveau cytoplasmique lorsque des sérums de patients anti-Sa positifs ou des anticorps anti-Sa purifiés ont été analysés en immunoflorescence sur des coupes fraîches de placenta humain. La présence du FR dans la plupart des sérums de patients atteints de PR pose un problème de liaison non spécifique sérieux en sachant que les coupes de tissus humains, tels que la rate,

le placenta et la membrane synoviale, sont particulièrement riches en immunoglobulines. Le développement d'un essai immunoenzymatique tel que l'ELISA ou d'une méthode d'agglutination efficace n'a pas été applicable en utilisant à la fois des extraits de tissus semi-purifiés contenant plusieurs protéines différentes et des sérums hyperimmuns provenant de divers patients. Il a également été impossible d'immunoprécipiter l'autoantigène Sa à partir d'extraits de tissus ou de fractions solubles de lysats de diverses lignées cellulaires. L'immunobuvardage, utilisé ici pour identifier le système Sa/anti-Sa, semble donc être la technique idéale pour l'identification et la caractérisation d'une protéine antigénique présente dans un extrait tissulaire semi-purifié. La purification de l'antigène Sa par HPLC, contrôlée par immunobuvardage, nous a permis de mettre au point un ELISA semi-quantitatif pour la détection des anticorps anti-Sa. La réactivité des anticorps anti-Sa semble donc être limitée à une reconnaissance de l'antigène Sa lié à un substrat de PVC en ELISA ou sous sa forme dénaturée en immunobuvardage. De plus, les protocoles d'absorptions de sérums anti-Sa positifs avec l'EPH ont démontrés la capacité de liaison des anticorps anti-Sa avec l'antigène Sa en solution. Ces résultats vont toutefois à l'encontre de ceux obtenus en immunodiffusion, où il a été impossible de détecter de bande de précipitation, de même qu'en IFI avec l'absence de marquage spécifique. Ces dernières observations peuvent-être la conséquence d'une concentration trop faible d'antigène Sa au niveau des sources antigéniques et des substrats utilisés ou d'une faible sensibilité des techniques d'immunodiffusion et d'immunofluorescence. Les résultats suggèrent donc que les autoanticorps anti-Sa reconnaissent possiblement l'antigène Sa sous sa forme native et/ou sous sa forme dénaturée. D'autre part, il est toutefois possible que l'antigène Sa soit sous forme dénaturé *in vivo* ou qu'il soit dénaturé lors de l'extraction du tissu et que les anticorps anti-Sa le détectent sous une forme dénaturée en ELISA. La possibilité d'identifier l'antigène Sa en ELISA peut être une méthode utile d'une part pour le suivi de la

purification ultérieure de l'antigène et d'autre part pour le dépistage des autoanticorps anti-Sa. Par contre, en raison de protéines contaminantes présentes à cette étape de purification, la réactivité d'un sérum doit nécessairement être confirmée par immunobuvardage.

Deuxièmement, la préparation de quantités suffisantes d'antigène Sa semi-purifié sur DEAE a été laborieuse et extrêmement difficile. Parce que la majeure partie des populations d'autoanticorps, tels que les anticorps anti-SS-A(Ro), ciblent spécifiquement des épitopes présents chez l'humain (Boire et Craft, 1989; Reichlin et Reichlin, 1989), l'utilisation de tissus humains comme source antigénique semblait préférable afin d'identifier et de caractériser de nouveaux systèmes autoimmuns. La méthode d'extraction antigénique, initialement développée pour isoler les antigènes SS-A(Ro) et SS-B(La), a peut-être été sous-optimale pour l'isolement de l'antigène Sa. L'identification de la protéine antigénique dans des extraits de rate humaine semble appuyer cette observation, puisque seulement 3 extraits sur 10 ont donné des concentrations satisfaisantes de l'antigène. Contrairement aux systèmes Ro et La, l'antigène Sa n'a pu être détecté en quantité suffisante dans des extraits de cellules en culture. De plus, la caractérisation immunochimique entre l'antigène Sa placentaire humain et bovin montre une réactivité préférentielle des autoanticorps anti-Sa purifiés par affinité avec la protéine antigénique isolée du tissu humain. Mis à part l'existence de sérums rhumatoïdes spécifiques avec de hauts titres d'anticorps anti-Sa, il est donc possible que l'antigène Sa ait été indétectable, ignoré ou simplement considéré comme un artefact non reproductible. Par la suite, l'autoantigène Sa a été identifié avec des concentrations satisfaisantes dans l'ensemble des extraits de placenta effectués. De plus, l'antigène Sa a été isolé avec succès dans plusieurs extraits de membrane synoviale rhumatoïde. La présence de l'antigène Sa dans le placenta humain a donc facilité l'isolement, la purification et la caractérisation du

système Sa. La protéine antigénique reconnue par les autoanticorps anti-Sa au niveau des extraits de placenta et de synoviale rhumatoïde est composée de trois bandes polypeptidiques de 53, 50 et 49 kD. Par contre, l'antigène Sa isolé de la rate humaine est composé d'un doublet polypeptidique de 50 kD. Malgré cette divergence de migration du polypeptide, les autoanticorps anti-Sa purifiés reconnaissent les mêmes déterminants antigéniques entre les antigènes Sa placentaire, splénique et synovial. Cette différence peut être le résultat d'une protéolyse moins importante lorsque la protéine est isolée de tissu frais tels que le placenta et la membrane synoviale, comparativement à la rate obtenue à la suite d'autopsie et où l'activité protéolytique risque d'être beaucoup plus importante. Effectivement, le poids moléculaire de l'antigène Sa diminue progressivement et son antigénicité s'atténue jusqu'à une disparition complète de l'immunoréactivité lorsque l'ERH est soumis à une protéolyse prononcée (résultats non présentés). D'autre part, l'existence d'isoformes du polypeptide Sa, obtenus à la suite d'épissages alternatifs ou de modifications post-transcriptionnelles différentes entre les tissus, pourrait être une seconde explication possible de la différence de taille de l'antigène Sa observée. Afin de vérifier la relation immunochimique entre les différentes bandes du même polypeptide, les anticorps dirigés contre chacune d'entre-elles ont été purifiés par affinité sur nitrocellulose. L'analyse de la réactivité croisée montre que chacune des bandes polypeptidiques partagent des déterminants antigéniques identiques et semblent correspondre à la même protéine ou à des protéines partageant des déterminants antigéniques communs. Le patron de reconnaissance de même que le degré de réactivité croisée observé entre les extraits de placenta et de synoviale rhumatoïde semblent toutefois être plus étroitement apparentés. Ce patron de reconnaissance obtenu en utilisant l'ERH est probablement le résultat d'une protéolyse excessive. De plus, le dépistage de certains sérums anti-Sa (40 patients) a été effectué de façon simultanée sur l'ERH et sur l'EPH. Les données recueillies

montrent une fois de plus que ces deux extraits possèdent des déterminants antigéniques identiques puisque les réactivités obtenues par immunobuvardage sont reproductibles d'un extrait à l'autre. L'autoantigène Sa apparaît donc comme un constituant normal de tissus humains tels que la rate et le placenta.

Troisièmement, cette étude montre avec évidence que l'autoantigène Sa est à la fois présent à des concentrations significatives dans les tissus synoviaux de patients atteints de PR et reconnu spécifiquement tant par les sérums anti-Sa positifs que par les liquides synoviaux provenant de certains de ces patients. Ces observations suggèrent fortement que la réponse autoimmune humorale peut cibler l'antigène Sa au site même de l'inflammation articulaire. À partir de ces résultats préliminaires, il est toutefois impossible de conclure que l'autoantigène Sa stimule directement la réponse autoimmune dans la PR, ou qu'il s'agisse d'une réponse secondaire à l'inflammation initiée via un mécanisme toujours inconnu. L'identification de l'antigène Sa dans des tissus normaux, tels que le placenta et la rate, de même que dans la membrane synoviale rhumatoïde, semble nettement indiquer que cette protéine n'est pas de nature exogène, i.e. n'apparaît pas *de novo* dans le tissu synovial à la suite d'une infection bactérienne ou virale quelconque. La difficulté d'obtenir du tissu synovial normal nous empêche de conclure que l'antigène Sa est un constituant normal ou qu'il résulte d'une surexpression dans le tissu synovial à la suite d'une réponse inflammatoire agressive. La présence de l'antigène dans l'ensemble des extraits de placenta vient toutefois appuyer l'hypothèse qu'il ne s'agit pas d'une surexpression de l'autoantigène. Les résultats obtenus dans les expériences comparatives entre l'antigène Sa et les extraits de tissus articulaires humains et canins suggèrent clairement qu'il ne s'agit pas d'une réactivité dirigée contre les composantes du cartilage articulaire, incluant le collagène de type II. Ces résultats centrés sur la caractérisation de l'antigène Sa au niveau du tissu synovial suggèrent,

une fois de plus, que cette protéine représente un autoantigène important dans la PR. Récemment, certains auteurs se sont attardés à l'identification de protéines du tissu synovial rhumatoïde détectées par des anticorps présents dans les liquides synoviaux de patients atteints de PR (Lafyatis et al., 1992). Plusieurs antigènes ont été identifiés par ces liquides synoviaux, dont une série de bandes polypeptidiques possédant des poids moléculaires entre 43 et 53 kD. Toutefois, en raison de l'utilisation d'extraits bruts (non purifiés) de synoviales rhumatoïdes, du petit nombre de liquides synoviaux rhumatoïdes testés et de l'absence de caractérisation approfondie des protéines antigéniques, il est impossible de déterminer si l'une ou l'autre de ces bandes polypeptidiques correspond spécifiquement à l'antigène Sa.

Quatrièmement, la détection des anticorps anti-Sa dans les sérums de patients est particulièrement spécifique pour la PR. Dû à un intérêt de moins en moins marqué de la recherche axée sur l'étude de la réponse autoimmune humorale rhumatoïde, comparativement au LED, par exemple, la réactivité anti-Sa n'a peut-être pas été examinée de façon systématique.

La protéine autoantigénique ciblée par les anticorps anti-Sa est composée de bandes polypeptidiques non sialylées de poids moléculaires se situant à environ 50 kD et n'interagissant pas avec les acides nucléiques. Ces caractéristiques permettent déjà de distinguer l'antigène Sa de plusieurs autres autoantigènes décrits précédemment (Tan, 1989, 1991). Malgré l'absence d'évidence d'une implication pathogénique dans la maladie, plusieurs observations décrites dans cette étude appuient l'implication d'un rôle significatif des autoanticorps anti-Sa dans la PR. Premièrement, en criblant des sérums provenant de différents patients par la méthode d'immunobuvardage avec l'antigène Sa semi-purifié, plus de 40% des patients rhumatoïdes produisent des anticorps anti-Sa. Deuxièmement, les anticorps anti-Sa

sont pratiquement absents dans l'ensemble des sérums de patients souffrant de diverses maladies rhumatismales non-rhumatoïdes et d'individus normaux. La spécificité remarquable de même que la valeur prédictive positive élevée du système anti-Sa dans la PR suggèrent que ces autoanticorps peuvent être complémentaires au FR, voir même le surpasser, dans le diagnostic de la maladie. Il faudra toutefois vérifier si cette spécificité demeurera aussi grande en testant un plus grand nombre de patients, d'autres populations de malades ou en utilisant des immunoessais plus sensibles que l'immunobuvardage. L'utilisation d'essais immunodiagnostiques ultrasensibles tels que l'ELISA conduit parfois à des résultats dont la sensibilité est de loin plus grande mais avec une spécificité diminuée. Si la sensibilité, la spécificité et la valeur prédictive positive restent inchangées ou presque, le système anti-Sa pourrait représenter un marqueur immunodiagnostique majeur de la PR et un outil formidable pour l'étude et la caractérisation des mécanismes pathogéniques conduisant aux manifestations rhumatoïdes. Troisièmement, les anticorps anti-Sa d'isotype IgG ont été détectés dans des phases précoces du développement de la PR. L'analyse des sous-classes d'IgG impliquées dans la réponse anti-Sa suggère que ces autoanticorps se caractérisent plus particulièrement par la prédominance de la sous-classe IgG₃ mais aussi par les trois autres sous-classes. Ces observations appuient l'hypothèse qu'une réponse autoimmune spécifique pour un antigène donné est en cours. Des résultats préliminaires ont démontrés une faible prédominance de la réponse anti-Sa d'isotype IgM. Sur 12 patients analysés, 2 seuls sérums provenant de patients atteints d'une PR sévère se sont révélés anti-Sa positifs tant pour l'isotype IgG que IgM. La corrélation entre le stade de la maladie (PR débutante vs. sévère), les sous-classes d'immunoglobulines anti-Sa impliquées et la présence de FR devra faire l'objet d'une étude systématique ultérieure. Quatrièmement, les résultats montrant la présence de concentrations significatives d'antigène Sa dans le tissu synovial rhumatoïde nous permet de poser l'hypothèse de

la production possible d'anticorps anti-Sa *in situ*. Toutefois, ces autoanticorps peuvent tout simplement provenir de la circulation plasmatique. En effet, les patients rhumatoïdes anti-Sa positifs au niveau sérique possèdent également de ces autoanticorps au niveau du liquide synovial. De plus, lorsque les échantillons de sérum et de liquide synovial ont été prélevés de façon simultanée chez un même patient, les titres des anticorps anti-Sa obtenus étaient comparables. La présence de l'antigène Sa dans le tissu synovial de même que des anticorps anti-Sa dans le liquide synovial permettent de poser l'hypothèse de la possibilité de formation de complexes immuns au site même de l'inflammation articulaire et suggèrent en plus la possibilité d'un rôle pathogénique des anticorps anti-Sa dans l'initiation ou le maintien du processus destructif observé dans la PR. Toutefois, la présence de complexes immuns Sa/anti-Sa dans l'articulation reste à être démontrée afin d'appuyer cette hypothèse. Cinquièmement, des résultats préliminaires concernant l'analyse en série de la réponse anti-Sa au cours de l'évolution et du traitement de la PR suggèrent que le titre des autoanticorps peut varier avec l'activité de la maladie ou avec un traitement efficace contrôlant la réponse inflammatoire articulaire. Toutefois, l'analyse systématique de la réponse anti-Sa au cours de l'évolution de la maladie fait l'objet d'une étude clinique en elle-même.

La purification ultérieure de l'EPH par chromatographie d'échange d'ions en gradient, où les fractions ont été suivies par ELISA et par immunobuvardage, nous a permis de montrer que l'antigène Sa élue du DEAE à des concentrations de NaCl se situant entre 210 et 240 mM. L'analyse des fractions riches en antigène Sa par SDS-PAGE et immunobuvardage à l'aide de conditions de séparation permettant une meilleure résolution ne nous a pas permis d'obtenir la triade polypeptidique pure. Par contre, lorsque les trois bandes immunoréactives de l'antigène Sa (53, 50 et 49 kD) ont été analysées sur gel de polyacrylamide coloré à l'argent, les bandes

polypeptidiques semblaient suffisamment bien isolées les unes des autres pour tenter un microséquençage peptidique. Les résultats du microséquençage sur PVDF de ces trois bandes polypeptidiques ont révélé que l'autoantigène Sa semble étrangement associé à deux protéines différentes. Lorsque comparées à des banques de séquences peptidiques (GenBank, SwissProt et NBRF), les deux bandes de plus faible poids moléculaire (bandes de 49 et 50 kD) ont démontré des séquences en N-terminal apparentées avec les résidus 71–89 de la vimentine humaine avec une homologie de 62.5% sur un total de 16 acides aminés. Remarquablement, les résultats de microséquence de ces deux bandes polypeptidiques homologues à la vimentine ont été obtenus à deux reprises en utilisant des extraits placentaires purifiés différents. Par ailleurs, le microséquençage en N-terminale de la bande polypeptidique de haut poids moléculaire (53 kD) a démontré une homologie de 100% (sur 20 résidus d'acides aminés) avec la sous-unité β de la prolyl 4-hydroxylase ou la PDI. Suite à ces résultats, il a été initialement proposé que l'antigène Sa soit composé de deux protéines distinctes avec des déterminants antigéniques communs reconnus par la même population d'autoanticorps. Cette hypothèse semble très peu probable puisqu'aucun partage peptidique n'a été obtenu entre la vimentine humaine et la PDI humaine à la suite de l'analyse comparative de l'homologie de séquence entre ces protéines via les banques peptidiques informatisées. De plus, cette différence d'homologie entre la bande de 53 kD et les deux bandes de 49 et 50 kD associées à l'antigène Sa ne correspond pas aux caractéristiques immunochimiques de la protéine montrant une réactivité croisée intense en utilisant des anticorps élués par affinité à partir de l'une ou l'autre des trois bandes polypeptidiques. Il est difficile d'expliquer pourquoi ces résultats de microséquençage correspondent à deux protéines de nature distinctes, d'une part, et d'autre part pour quelle raison la vimentine ne serait pas présente au niveau de la bande de 53 kD puisque son poids moléculaire est d'environ 52 kD. Une première

explication possible est que la PDI soit présente de façon primordiale au niveau de la bande de 53 kD, ne permettant pas l'identification du polypeptide associé à la vimentine par microséquençage. Une seconde explication est que la vimentine ait été dégradée au cours de l'extraction, résultant à deux bandes polypeptidiques de 49 et 50 kD.

La vimentine fait partie de la superfamille des filaments intermédiaires, qui sont des constituants du cytosquelette des cellules eucaryotes (Nagle, 1994). Cette protéine a un poids moléculaire de 52 kD et elle est exprimée dans des cellules d'origine mésenchymateuses et épithéliales, particulièrement dans des cellules fibroblastiques. De plus, il a été démontré que la vimentine peut être coexprimée avec d'autres filaments intermédiaires, tels que la cytokératine et la desmine. Plusieurs travaux ont identifié la présence d'autoanticorps dirigés contre la vimentine dans les sérums de patients atteints de diverses maladies rhumatismales, incluant la PR, le LED, le SS (Alcover et al., 1984, 1985; Fabregas-Canales et al., 1989; Sanchez et al., 1990; Senecal et al., 1993). Par conséquent, la prévalence (~ 10%) et la spécificité de ces autoanticorps ne semblent pas indiquer un intérêt particulier comme marqueur diagnostique pour la PR. Face à ces observations, deux séries d'expériences ont été réalisées afin de vérifier l'existence d'une homologie possible entre l'antigène Sa et la vimentine. Premièrement, des sérums rhumatoïdes anti-Sa positifs et des témoins ont été testés en immunobuvardage avec l'une ou l'autre des sources antigéniques. Bien que certains sérums détectent la vimentine, il n'existe pas de corrélation évidente entre la réactivité contre l'antigène Sa et la vimentine. Deuxièmement, des expériences d'absorptions croisées de sérums anti-Sa positifs et de témoins ont été effectuées en utilisant l'antigène Sa semi-purifié, différentes sources de FI purifiés de même que de la vimentine bovine purifiée commerciale. De plus, des anticorps anti-Sa purifiés par immunoaffinité et des anticorps polyclonaux et monoclonaux

dirigés contre la vimentine ont été utilisés afin d'étudier la réactivité croisée entre l'antigène Sa et la vimentine en immunobuvardage. L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que l'antigène Sa n'est pas immunochimiquement lié aux filaments intermédiaires, mais peut être associé d'une manière ou d'une autre à un complexe macromoléculaire, tel qu'il a été décrit récemment pour le système autoimmun filaggrine/anti-filaggrine (Simon et al., 1993). D'autre part, les résultats obtenus à l'aide des anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-vimentine montrant la présence de bandes polypeptidiques liées à la vimentine peuvent suggérer la présence de vimentine contaminante lors du microséquençage des bandes polypeptidiques associées à l'antigène Sa.

La prolyl 4-hydroxylase (EC 1.14.11.2) est un polypeptide multifonctionnel important dont le rôle est de catalyser l'hydroxylation co- et post-transcriptionnelle des résidus proline du pro-collagène en collagène (Kivirikko et al., 1989). Cette modification s'effectue dans la lumière du réticulum endoplasmique et s'avère essentielle pour la formation de molécules en triple-hélice stables à partir de monomères de procollagène nouvellement synthétisés. La forme active de l'enzyme est tétramérique, composée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes beta ($\alpha_2 \beta_2$) ayant un poids moléculaire d'environ 240 kD. Les poids moléculaires de chacune des sous-unités α et β sont d'environ 64 kD et 60 kD, respectivement. La sous-unité β de la prolyl 4-hydroxylase est identique, tant au niveau peptidique que de l'ADNc, à la PDI (EC 5.3.4.1) (Koivu et al., 1987) de même qu'à la *thyroid hormone binding globulin* (THBG). En plus d'être la sous-unité β de la prolyl 4-hydroxylase, la PDI est une protéine eucaryote ubiquitaire, hautement abondante, caractérisée pour catalyser la formation de ponts disulfures et l'isomérisation lors de la biosynthèse et sécrétion des protéines (Weissman et Kim, 1993). En raison de la présence de PDI dans la grande majorité des types cellulaires, l'autoantigène Sa aurait dû avoir été

identifié dans les divers extraits de cellules et de lignées cellulaires utilisés dans cette étude. Malgré cette divergence difficile à expliquer et face aux résultats démontrant une homologie parfaite entre la bande de 53 kD associée à l'antigène Sa avec la PDI, l'ADNc commercial de la PDI humaine de 1540 pb a été amplifié par PCR et sous-cloné dans un vecteur d'expression (pGEX-KG). Ce polypeptide est composé de 491 résidus d'acides aminés et d'une séquence signal de 17 acides aminés additionnels (Pihlajaniemi et al., 1987). Les protéines de fusion (GST-PDI) et recombinante (PDIr), qui possèdent des poids moléculaires respectifs de 84 kD et 57 kD, ont été exprimées et isolées avec succès. Certains sérums de patients atteints de PR, de LED, d'arthrite psoriasique, d'ostéoporose et d'arthrose ont détecté la PDIr en immunobuvardage. Aucune corrélation n'a pu être établie entre la réactivité contre l'antigène Sa et la PDIr humaine. Les expériences d'absorptions croisées de sérums anti-Sa positifs avec l'EPH ou avec la GST-PDI purifié ne suggèrent pas non plus de similarité ou de partage antigénique entre l'antigène Sa et la PDI. Des expériences additionnelles ont démontrées qu'à la suite d'absorptions de sérums anti-PDI positifs avec des lysats de bactéries transformées par le vecteur parental (pGEX-KG seul), la réactivité contre la PDIr a complètement été éliminée (résultats non présentés). Cette observation permet de suggérer, d'une part l'existence de protéines homologues à la PDI (*PDI-like*) au niveau bactérien et d'autre part, l'initiation et la production d'anticorps anti-PDI, sous forme d'anticorps naturels, chez certains individus exposés. Cette dernière hypothèse pourrait expliquer la réponse anti-PDI non-spécifique, observée dans les sérums de patients atteints de maladies rhumatismales diverses.

L'identification de la PDI comme autoantigène reconnu par certains sérums de patients atteints de maladies rhumatismales n'est pas une observation inintéressante. Un certain nombre d'études ont démontré l'existence de problèmes au niveau du

métabolisme du collagène dans les maladies du tissu conjonctif, principalement via une activité augmentée de la prolyl 4-hydroxylase conduisant à la fibrose de certains tissus (Kuutti-Savolainen et al., 1980; Kivirikko et al., 1991). De ce fait, plusieurs tentatives ont été réalisées dans le but de développer des inhibiteurs de la prolyl 4-hydroxylase pour supprimer la production excessive de collagène et d'agir comme agents anti-fibrotiques dans le traitement de maladies associées à l'accumulation de collagène, telle la sclérodermie (Fuller, 1981; Kawaguchi et al., 1992a, 1992b).

L'identification d'autoanticorps dirigés contre la PDI chez les patients atteints de maladies rhumatismales constitue une observation originale. Leur prévalence, leur spécificité, leurs caractéristiques immunochimiques de même que leur rôle physiopathologique restent l'objet d'études ultérieures. Enfin, il est théoriquement concevable que ces autoanticorps anti-PDI puissent interférer avec les fonctions extracellulaires normales de la PDI, la prolyl 4-hydroxylase et/ou la THBG.

Finalement, avec l'ensemble de ces particularités de même que des résultats concernant la caractérisation de l'antigène, le système Sa semble être définitivement différent des autres systèmes autoimmuns décrits précédemment comme étant associés à la PR. Le système autoimmun Sa/anti-Sa semble être non seulement un marqueur potentiel pour le diagnostic de la PR, mais permet également d'initier de nouvelles avenues de recherche axées sur la compréhension des mécanismes pathophysiologiques de même que sur le traitement de la maladie. Des expériences ultérieures devront être axées sur la purification fine de l'antigène Sa, via des méthodes biochimiques et immunologiques plus raffinées dans le but d'isoler les bandes polypeptidiques immunoréactives pour ensuite procéder au microséquençage afin de cloner l'antigène Sa.

Les autoanticorps anti-calpastatine semblent associés au processus inflammatoire chronique de la PR.

Certains autoanticorps dirigés contre des constituants cellulaires exprimés à la surface des cellules ou sécrétés dans l'environnement extracellulaire peuvent être impliqués dans des processus pathogéniques de certaines maladies autoimmunes (Tan, 1991; Burman et Baker, 1985; Schonbeck et al., 1990; Plotz, 1992; Naparstek et Plotz, 1993). Il existe des évidences que certains autoanticorps associés spécifiquement à des maladies autoimmunes ont la capacité d'interagir directement avec des enzymes et même de supprimer leur activité enzymatique (Tan, 1991; Naparstek et Plotz, 1993). Des travaux réalisés récemment suggèrent que certains autoanticorps peuvent également permettre une augmentation de l'activité protéolytique de certaines enzymes en bloquant directement leurs inhibiteurs spécifiques. Parmi ceux-ci, des anticorps dirigés contre l'inhibiteur C1 ont été identifiés dans les sérums de patients souffrant de sérieux épisodes d'oedème angioneurotique et de déficience acquise en C1 (Jackson, 1991). D'autres études ont démontré la présence d'autoanticorps dirigés spécifiquement contre la protéinase 3 (ou myéloblastine) dans les sérums de patients atteints de granulomatose de Wegener. Ces autoanticorps semblent interférer dans l'interaction de cette protéinase à sérine avec son inhibiteur naturel, l' α 1-antitrypsine (van de Weil et al., 1992; Dalpé et al., 1993). L'étude présentée ici, centrée sur l'identification et la reconnaissance de la calpastatine humaine comme autoantigénique, semble fournir un exemple additionnel de l'existence d'autoanticorps dirigés contre un polypeptide recombinant hautement homologue avec une portion d'un inhibiteur de protéinase.

En criblant une bibliothèque d'expression d'ADNc de placenta humain avec des sérums de patients atteints de PR érosive, un fragment de 950 pb (RA-1) codant pour un polypeptide possédant une homologie quasi complète (99.89%) avec la

calpastatine humaine a été identifié. La calpastatine est composée de 5 domaines distincts qui contiennent environ 140 résidus d'acides aminés chacun. Le domaine situé en NH₂-terminal (domaine L) est non homologue avec les quatre autres domaines et ne possède aucune activité inhibitrice. Par contre, chacun des quatre domaines situés en COOH-terminal (domaines 1 à 4) est en grande partie répétitif et contient une séquence consensus (TIPPXYR) associée spécifiquement à l'activité inhibitrice de la calpastatine. De ce fait, des études récentes effectuées en utilisant des fragments d'ADNc sous-clonés et exprimés à l'aide de vecteurs d'expression ont démontré avec évidence que chacun des 4 domaines homologues possède la capacité d'inhiber l'activité protéinase des calpaïnes (Emori et al., 1988). Le fragment RA-1 cloné code pour un polypeptide hautement homologue à deux des quatre séquences répétitives associées à l'activité inhibitrice, soit les domaines 3 et 4 de la calpastatine humaine (Figures 28 et 29). Certaines évidences suggèrent que le clone d'ADNc RA-1 provient de l'ARNm de la calpastatine. En premier lieu, une seule paire de base sur un total de 950 pb (i.e. homologie de 99.89%) diffère entre l'ADNc du clone RA-1 et la séquence de l'extrémité 3' de l'ADNc de la calpastatine de foie humain récemment publiée; notamment, cette homologie de séquence se situe dans la portion codante de même que dans la portion non codante de 95 pb adjacente. En second lieu, cette seule différence de séquence a également été retrouvée dans un clone d'ADNc additionnel codant pour le domaine 4 et l'ensemble de la région 3' non codante de la calpastatine, incluant le signal de polyadénylation et la queue poly-A. Ce clone additionnel a récemment été obtenu en recriblant la bibliothèque de placenta humain avec l'ADNc du clone RA-1 comme sonde (résultats non présentés). En troisième lieu, cette différence nucléotidique unique n'est pas observée lorsque le clone RA-1 est comparé aux ADNc de la calpastatine de porc de même que de lapin. Ces résultats peuvent permettre de suggérer qu'il s'agit soit d'un

polymorphisme au niveau de l'ARNm de la calpastatine ou d'une erreur de séquençage ayant pu être insérée dans le Genbank pour la calpastatine humaine.

En exprimant la RA-1r préalablement sous-clonée dans le vecteur d'expression pGEX-4T-1, plus de 45% des patients atteints de PR produisent des autoanticorps spécifiquement dirigés contre la protéine recombinante, comparativement à moins de 5% des patients témoins et des individus normaux. Cette immunoréactivité contre la RA-1r permet de poser l'hypothèse d'une réponse autoimmune pouvant interférer spécifiquement au niveau de l'interaction entre la calpastatine et les calpaïnes. La calpastatine est l'inhibiteur spécifique des calpaïnes, qui sont des protéinases à cystéine activées par le calcium. Cette hypothèse semble théoriquement concevable; toutefois, elle demeure l'objet d'études de caractérisation *in vitro* ultérieures qui mettront en évidence une interférence des autoanticorps anti-calpastatine au niveau de l'activité inhibitrice de la calpastatine sur les calpaïnes.

Certaines enzymes protéolytiques sont reconnues pour jouer un rôle important dans la destruction des composantes articulaires. Ces protéinases sont regroupées en trois grandes familles: les métalloprotéinases (MMPs), les protéinases à sérine et les protéinases à cystéine (Poole, 1993). L'importance relative de ces protéinases et de leurs inhibiteurs respectifs dans la destruction de la matrice articulaire est actuellement en cours de caractérisation et reste également à être définitivement démontré *in vivo*. Toutefois, des données récentes suggèrent que certaines protéinases à cystéine semblent avoir un rôle important dans ce processus, dont plus particulièrement les calpaïnes et leur inhibiteur naturel, la calpastatine (Buttle, 1993; Lenarcic et al., 1988; Suzuki et al., 1992). Premièrement, certains travaux ont démontré que les calpaïnes sont présentes à des concentrations plus élevées dans le liquide synovial (Maciewicz et Etherington, 1988; Fukui et al., 1989; Gabrijelcic et

al., 1990; Suzuki et al., 1990; Huet et al., 1992) de même que dans la membrane synoviale (Yamamoto et al., 1992) de patients atteints d'arthrites rhumatoïdes érosives. Deuxièmement, les calpaïnes peuvent être sécrétées *in vitro* en utilisant des cellules fibroblastiques isolées du tissu synovial puis stimulées par le TNF α et l'IL-1 (Huet et al., 1993). Troisièmement, il a été démontré avec évidence que les calpaïnes sont capables de dégrader avec efficacité les composantes de la matrice articulaire et que la calpastatine est en mesure d'inhiber spécifiquement cette activité protéolytique (Fukui et al., 1989; Suzuki et al., 1990; Suzuki et al., 1992). Et quatrièmement, des travaux réalisés récemment, à l'aide de modèles d'arthrite à adjuvant chez le rat et d'arthrite à collagène chez la souris, ont démontré que des inhibiteurs de protéinases à cystéine (CPIs) synthétiques semblaient agir comme agents anti-rhumatismaux pouvant bloquer l'activité destructive dans l'articulation (Esser et al., 1994).

Dans des conditions normales, les protéinases appartenant à chacune des trois familles sont inactivées via leurs inhibiteurs naturels: soit les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases pour les MMPs (McCachren, 1991) , les serpins pour les protéinases à sérine (Opdenakker et Van Damme, 1992), et les CPIs pour les protéinases à cystéine. Les inhibiteurs de protéinases à cystéine naturels font partie d'une superfamille qui inclut les familles des cystatines, des stéfines et des kininogènes. De par ses caractéristiques uniques et de sa spécificité inhibitrice pour les calpaïnes, la calpastatine ne fait pas partie de cette superfamille (Croall et DeMartino, 1991). Des travaux récents ont suggéré qu'un déséquilibre du ratio des MMPs et de leurs inhibiteurs naturels semblait être à la base de la dégradation du cartilage articulaire chez les patients atteints d'arthrose (Dean et al., 1989). Il a également été démontré que la calpastatine est moins abondante que les calpaïnes dans le liquide synovial de patients atteints de PR (Yamamoto et al., 1992). Ces

observations permettent donc de déduire qu' un ratio protéinase/inhibiteur défavorable chez certains patients rhumatoïdes pourrait être associé à des conditions arthritiques plus sévères et destructives. Les autoanticorps dirigés contre la calpastatine pourraient donc être totalement ou partiellement responsables de ce déséquilibre, en se liant et en inactivant spécifiquement l'inhibiteur après sa synthèse, son expression sur la membrane plasmatique et / ou sa sécrétion *in vivo* dans l'espace extracellulaire. Cette réactivité spécifique résulterait d'une part en une inflammation médiée par les complexes immuns formés et d'autre part en une activité incontrôlée des calpaïnes dans l'environnement articulaire (Figure 35).

Mécanisme d'interférence immune

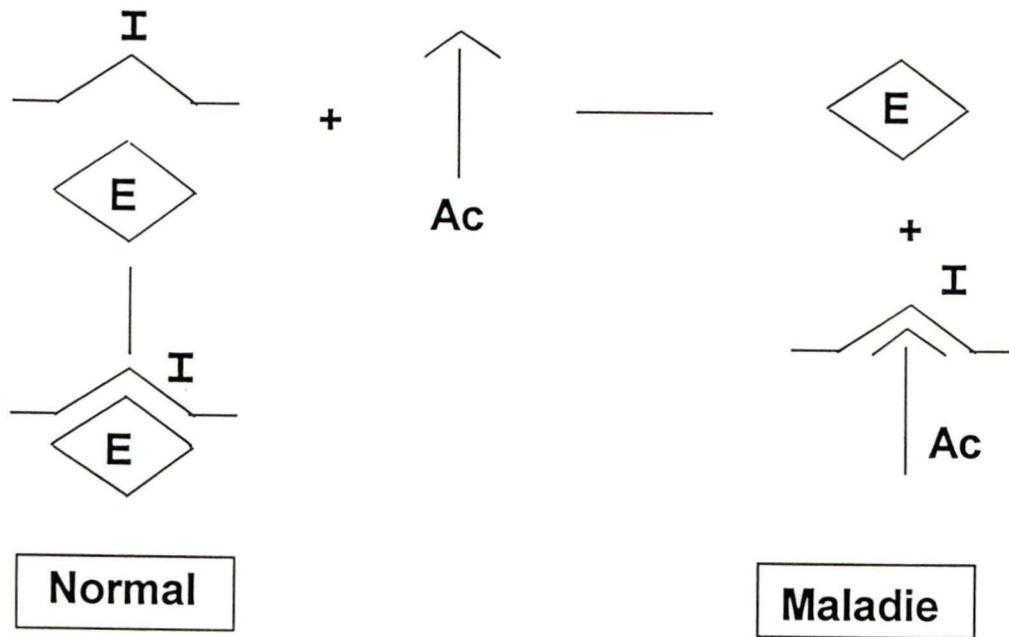


Figure 35: Représentation schématique de l'interaction entre les autoanticorps, l'inhibiteur ciblé et l'enzyme protéolytique. Chez l'individu normal, l'interaction entre l'inhibiteur (I) et l'enzyme protéolytique (E) s'effectue normalement. Chez l'individu malade, la présence d'autoanticorps pourrait déstabiliser les complexes normalement formés entre I et E. Dans ce cas, les autoanticorps se lieraient directement sur le site actif de I ou près de ce site et interféreraient avec l'inhibition spécifique de E. Les complexes immuns formés entre l'autoanticorps et son antigène cible pourraient entraîner une réponse inflammatoire articulaire. De plus, l'interférence entraînerait une activité protéolytique non contrôlée qui serait aussi responsable d'une réaction inflammatoire destructive.

Malgré un moins grand nombre de patients testés pour la présence d'anticorps anti-RA-1 (97 patients) comparativement à la détection des anticorps anti-Sa (482 patients), il est important de souligner que la fréquence des anticorps anti-RA-1r (45.5%) correspond vraisemblablement à la fréquence des anticorps anti-Sa (42.7%) chez les patients rhumatoïdes. Des 44 sérums rhumatoïdes analysés pour les deux systèmes, 31 se sont révélés concordants (18 anti-Sa et anti-RA-1 positifs et 13 négatifs pour les deux antigènes) et 13 se sont révélés discordants (3 anti-RA-1 positifs seulement et 10 anti-Sa positifs seulement). Les 53 sérums témoins ont tous été négatifs pour les deux systèmes. Cette distinction du point de vue de l'immunoréactivité de l'antigène Sa purifié biochimiquement et la protéine RA-1r avec des sérums rhumatoïdes constitue une observation intéressante. Les expériences ultérieures d'absorption de sérums anti-Sa positifs avec différentes concentrations de la protéine RA-1r n'ont pas réussi à dépléter complètement leur réactivité contre l'antigène Sa placentaire. Bien que cette déplétion ne soit pas complète, les résultats montrent une inhibition dose-dépendante de la réactivité anti-Sa à la suite de l'absorption de sérums avec la RA-1r. Plusieurs explications axées sur l'autoantigénicité de certaines protéines peuvent être soulevées afin d'interpréter ces résultats (Van Regenmortel, 1992). Premièrement, la protéine RA-1r ne possède pas tous les épitopes retrouvés sur l'autoantigène correspondant à la protéine retrouvée *in vivo*; certains déterminants antigéniques peuvent être localisés dans la portion NH₂-terminal de la calpastatine sans être inclus dans la partie codée par le clone RA-1; d'un autre côté, la protéine RA-1r peut aussi ne pas avoir certains sites antigéniques obtenus après modification post-transcriptionnelle. Deuxièmement, la protéine recombinante a été analysée sur membrane de nitrocellulose dans des conditions de dénaturation; la protéine RA-1r pourrait donc avoir perdu certains déterminants conformationnels retrouvés sur la protéine antigénique native correspondante *in vivo*. Troisièmement, les autoanticorps anti-

RA-1r et anti-Sa peuvent tout simplement représenter des sous-populations d'autoanticorps distincts tout en étant des systèmes immuns liés de très près. Cette situation pourrait être similaire aux systèmes anti-Ro et anti-La dans le SS et le LED de même qu'aux systèmes anti-U1 RNP et anti-Sm dans le LED (Tan, 1991). L'existence d'autoanticorps dirigés uniquement contre la protéine RA-1r dans les sérums de patients rhumatoïdes dépourvus d'anticorps anti-Sa pourrait appuyer cette dernière hypothèse. La caractérisation plus poussée du ou des épitopes reconnus par ces deux populations d'autoanticorps sera nécessaire afin de répondre définitivement à cette question.

Finalement, ces travaux qui démontrent que la calpastatine est reconnue comme autoantigénique par un nombre significatif de sérums rhumatoïdes fournissent une avenue potentielle de recherche, tant du point de vue diagnostique que thérapeutique. Les travaux futurs devront tenter d'isoler la pleine longueur de l'ADNc codant pour la calpastatine humaine afin de caractériser les épitopes immunodominants de la molécule. De plus, d'autres travaux devront être centrés sur la démonstration de la capacité des autoanticorps à bloquer l'activité inhibitrice de la calpastatine sur les calpaïnes. Néanmoins, la présence de complexes immuns contenant des anticorps dirigés contre la calpastatine au niveau de l'articulation de patients souffrant de PR érosive sera également une observation substantielle. Enfin, une étude de corrélation clinique entre la présence des autoanticorps dirigés contre la calpastatine et la forme érosive de la maladie devra être réalisée sur une base systématique dans des groupes de patients rhumatoïdes et autres maladies rhumatismales. Cette approche devra être effectuée particulièrement si des inhibiteurs de protéinases à cystéine synthétiques sont visés pour des fins thérapeutiques. Cette orientation de recherche axée sur l'étude des protéinases et de leurs inhibiteurs semble prometteuse,

d'une part pour définir certaines composantes impliquées dans la pathogénèse de la PR et d'autre part pour la réduction de la morbidité de la maladie.

CONCLUSION

À partir des résultats obtenus dans ce travail, certaines conclusions peuvent être tirées:

- Le système autoimmun Sa/anti-Sa est un nouveau marqueur sérologique hautement spécifique pour la polyarthrite rhumatoïde.
- Les anticorps anti-Sa sont détectés dans 42.7% des sérums de patients atteints de PR, avec une spécificité de 98.9%. De plus, ces autoanticorps sont présents dans 29% des sérums de patients au tout début de la maladie.
- Les anticorps anti-Sa sont également détectables dans 27% des sérums rhumatoïdes négatifs pour le facteur rhumatoïde. La présence de ces autoanticorps indépendamment du facteur rhumatoïde suggère donc que le système Sa pourrait compléter le facteur rhumatoïde comme outil diagnostique.
- L'autoantigène Sa est une protéine non glycosylée, de poids moléculaire d'environ 50 kD. Il est distinct des autres systèmes décrits dans la PR, tels que le FR, les EBNA, le RA33, les composantes du cartilage articulaire, les HSP et la filaggrine.
- La détection des anticorps anti-Sa est dépendante de la source antigénique utilisée. L'antigène Sa est présent dans des tissus humains normaux, tels que la rate et le placenta, mais absent dans l'ensemble des lignées cellulaires analysées.
- Certaines observations suggèrent une implication pathogénique possible des autoanticorps anti-Sa via la formation et la déposition de complexes immuns dans

l'articulation: l'antigène Sa est présent dans le tissu cible, la membrane synoviale rhumatoïde; les anticorps anti-Sa sont détectés dans un certain nombre de liquides synoviaux rhumatoïdes analysés; le titre des anticorps varie avec l'activité de la maladie ou avec un traitement efficace chez quelques patients testés.

- L'antigène Sa isolé de la rate, du placenta et du tissu synovial rhumatoïde possède des déterminants antigéniques communs.
- Les résultats du microséquençage peptidique démontrant une homologie avec la vimentine et la PDI ne sont pas arrivés à révéler l'identité moléculaire exacte de l'antigène Sa. La PDI est toutefois reconnue comme autoantigénique par certains sérums de patients atteints de diverses maladies rhumatismales.
- Des étapes de purification ultérieures permettront de cloner l'autoantigène Sa et de déterminer sa nature moléculaire.
- En criblant une bibliothèque d'expression de placenta humain dans le vecteur λ gt11, un clone d'ADNc (RA-1) de 950 pb a été identifié à l'aide de sérums provenant de patients atteints de PR érosive.
- Le clone RA-1 est identique à l'ADNc codant pour deux des quatre domaines inhibiteur en COOH-terminal de la calpastatine humaine. La calpastatine est l'inhibiteur naturel des calpaïnes, des protéinases à cystéine récemment décrites comme étant impliquées dans la destruction des structures articulaires chez les patients atteints d'arthrite érosive.

- Les protéines de fusion et recombinante codées par le clone RA-1 sont reconnues spécifiquement par 45.5% des sérums de patients atteints de PR, contrairement à 3.8% des sérums de patients témoins et d'individus normaux. Les études comparatives entre l'antigène Sa et la protéine RA-1r proposent que ces deux protéines ne sont pas identiques du point de vue moléculaire mais semblent posséder des déterminants antigéniques partagés, suggérant une relation antigénique possible.
- Les autoanticorps dirigés contre la calpastatine constituent un nouveau marqueur sérologique associé à la PR et peuvent avoir une implication pathogénique potentielle dans la maladie en interférant dans l'inhibition physiologique des calpaïnes.
- Finalement, une évaluation systématique de la réponse autoimmune humorale contre l'antigène Sa et la calpastatine semble essentielle, principalement afin de déterminer leur utilité clinique en tant qu'outils diagnostiques et/ou pronostiques pour la polyarthrite rhumatoïde.

FIGURES

Figure 4: Détection spécifique en immunobuvardage du polypeptide de 50 kD de l'ERH en utilisant des sérums rhumatoïdes anti-Sa. L'ERH séparé par SDS-PAGE et transféré sur nitrocellulose (lignes 1-6) a été incubé avec des sérums lupiques anti-SS-A(Ro) (lignes 1 et 2), le sérum Savoie (ligne 3), un sérum rhumatoïde anti-SS-A(Ro) négatif (ligne 4), un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne 5) et un sérum normal (ligne 6). La forme réduite de l'IgG humaine révélée avec le second anticorps (anti-IgG portion Fc) (ligne 7). La migration de l'antigène Sa (lignes 3 et 4) est différente des autres autoantigènes (Ro-52 kD, Ro-60kD, La-48 kD et La-35 kD) de même que de la chaîne lourde de l'IgG.

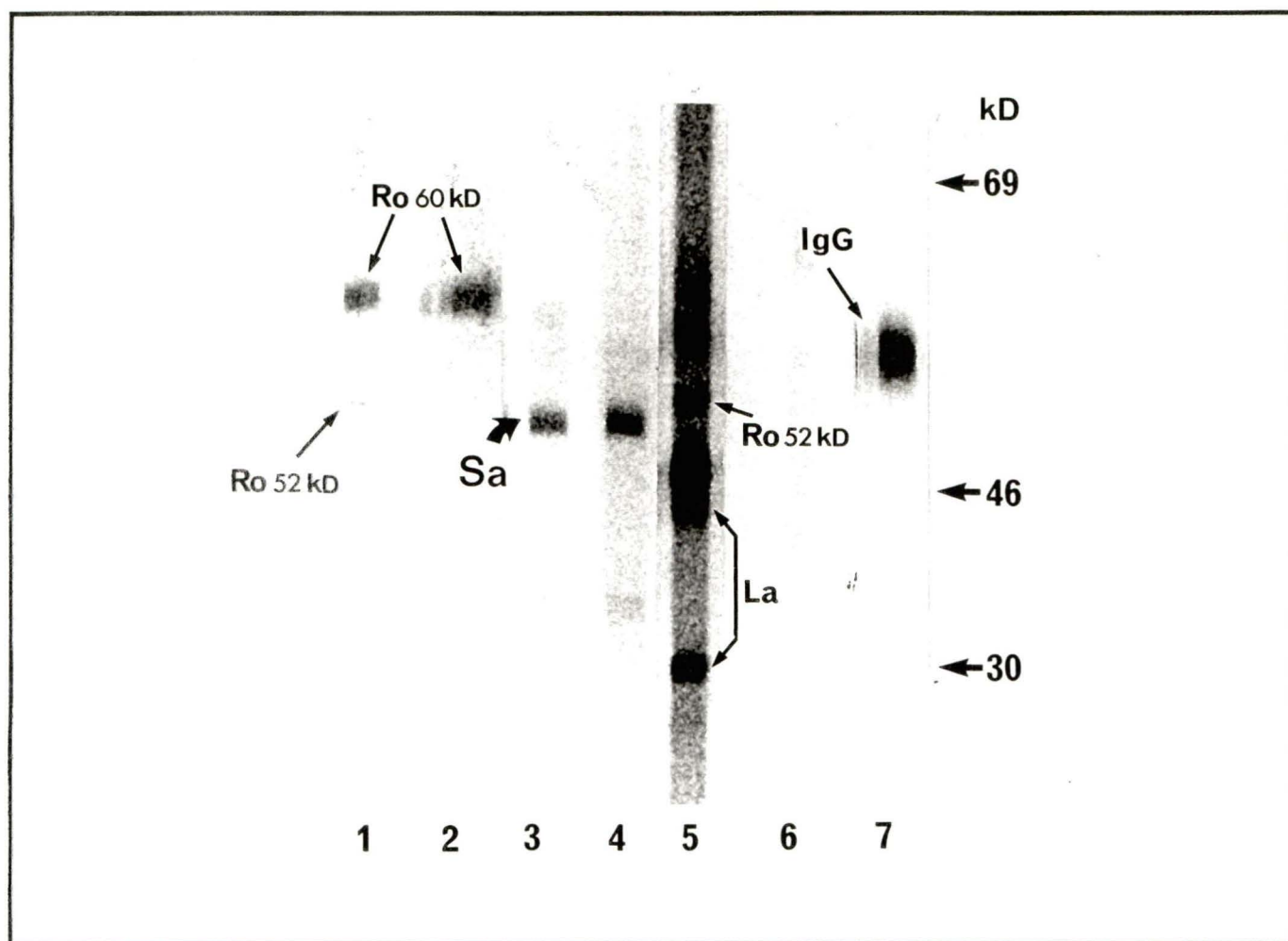


Figure 5: Immunobuvardage de l'ERH avec des conditions de séparation permettant une meilleure résolution des bandes. L'extrait de rate a été séparé par SDS-PAGE en utilisant un gel de 1.5 mm x 14 cm x 14 cm, avec un courant constant de 25 mA pendant 4–5 heures. Cet extrait de rate humaine ne contient pas de RNP Ro–52 kD (ligne 2), telle que détectée avec le sérum incubé à la ligne 1 de la figure 4. La ligne 1 contient des anticorps anti–SS–A(Ro)–60 kD purifiés par affinité. Le sérum Sa original (ligne 5) et les anticorps anti–Sa purifiés par affinité (ligne 4) détectent tous deux un doublet polypeptidique migrant à environ 50 kD. La ligne 3 contient un sérum normal.

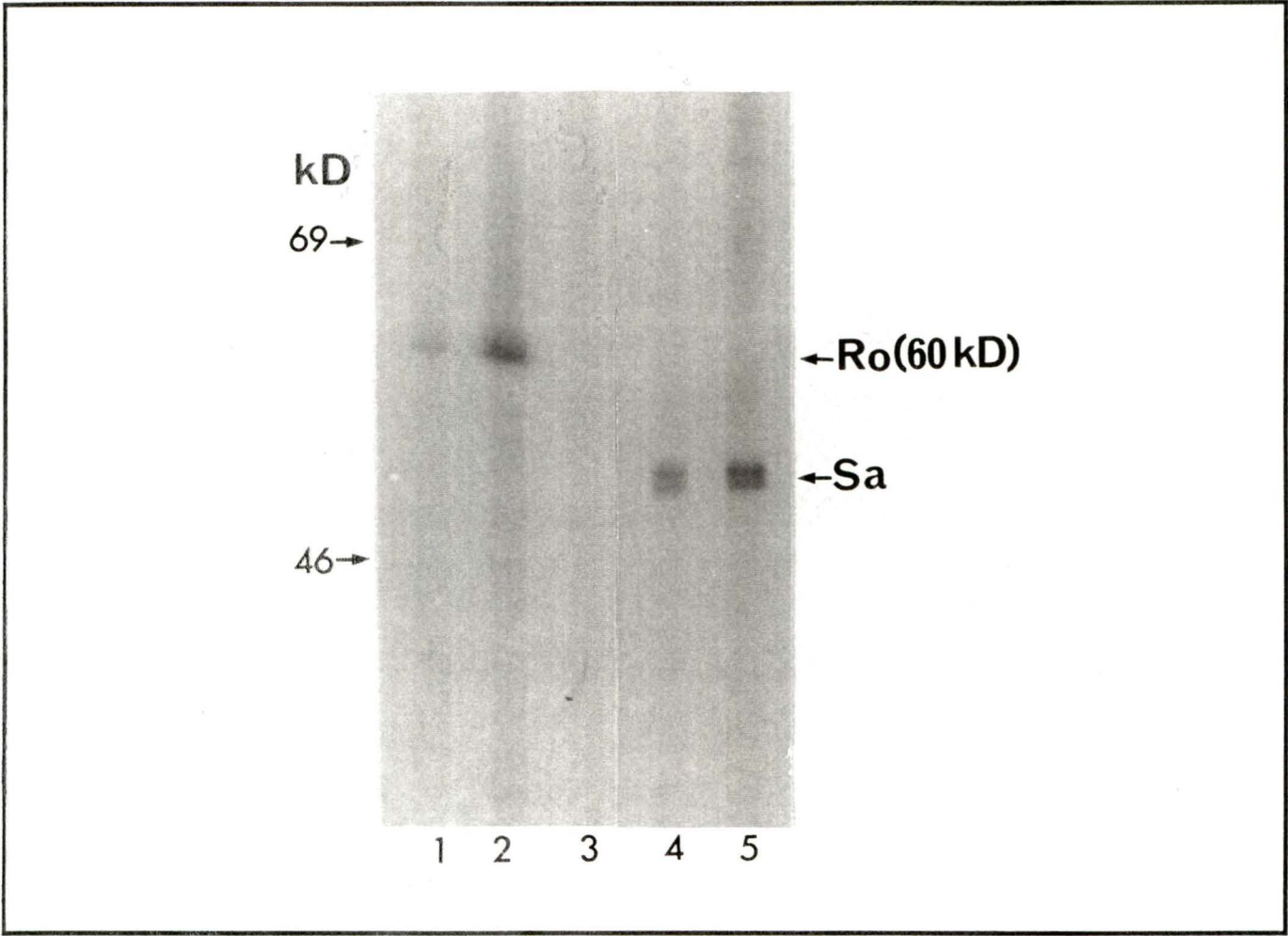


Figure 6: Criblage typique de sérums par immunobuvardage en utilisant l'ERH comme source antigénique. La membrane de nitrocellulose a été incubée avec 27 sérums de patients différents: un sérum normal (ligne 1), le sérum témoin anti-Sa positif (lignes 3 et 26) et 22 échantillons sériques provenant de patients dont la spécificité est inconnue (lignes 4–25). Les sérums ont été testés à la dilution 1/50. Les lignes 3–9, 18, 19, 21, 25 et 26 reconnaissent l'antigène de 50 kD selon le même patron de liaison que les anticorps anti-Sa témoins. L'ensemble des sérums positifs proviennent de patients atteints de PR. Les bandes polypeptidiques identifiées par les sérums témoins ont servi de marqueurs de poids moléculaires.

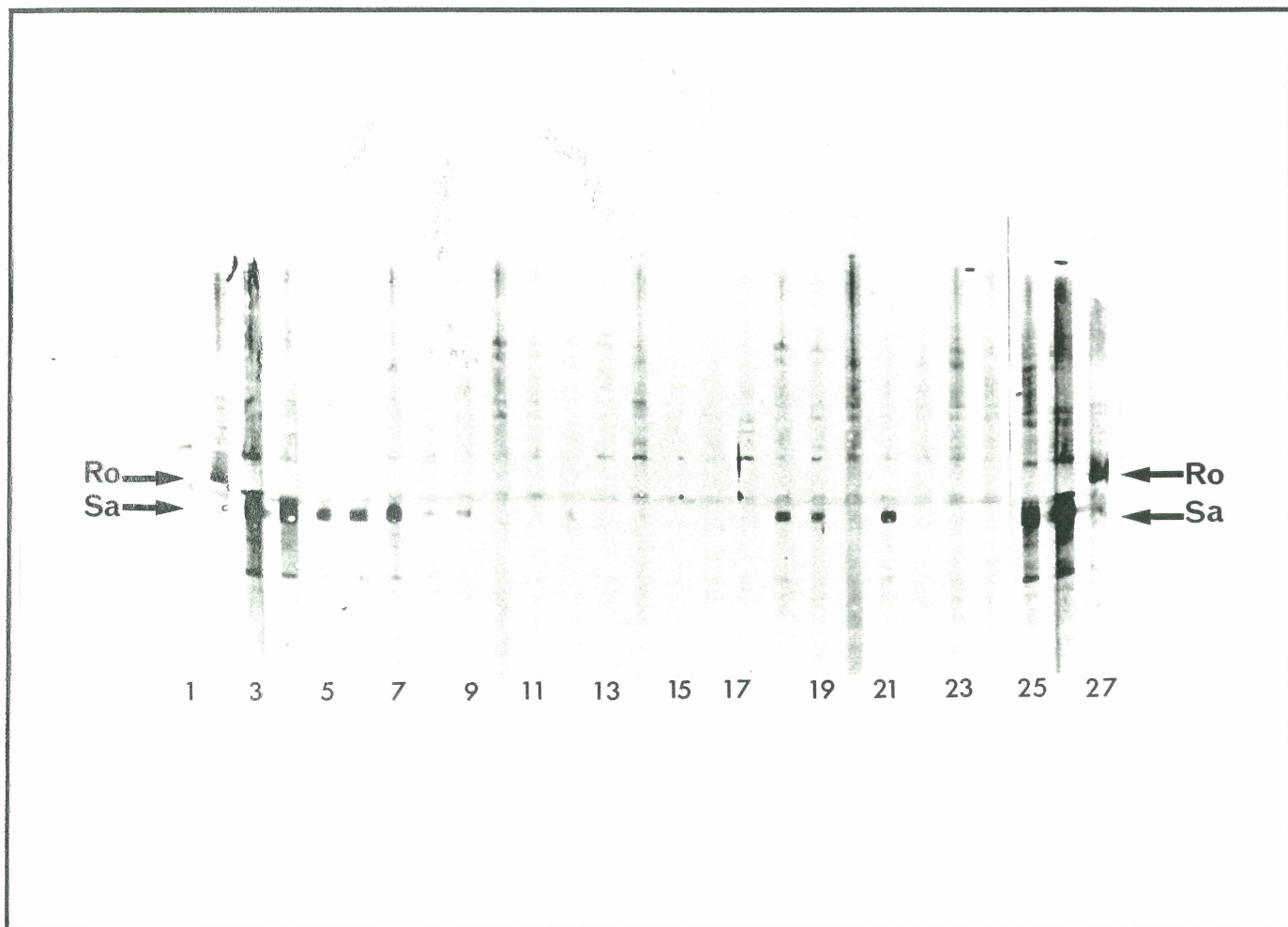


Figure 7: Détection de l'antigène Sa par immunobuvardage avec l'EPH semi-purifié, en utilisant des sérums anti-Sa. L'EPH séparé et transféré sur nitrocellulose a été incubé avec le sérum anti-Sa original (ligne 1), un sérum rhumatoïde anti-Sa positif sur l'extrait de rate (ligne 3), un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne 4) et le sérum d'un individu normal (ligne 2). L'autoantigène Sa est composé de trois bandes polypeptidiques majeures de 53, 50 et 49 kD, différentes des systèmes Ro-60 kD et La-48 et -35 kD.

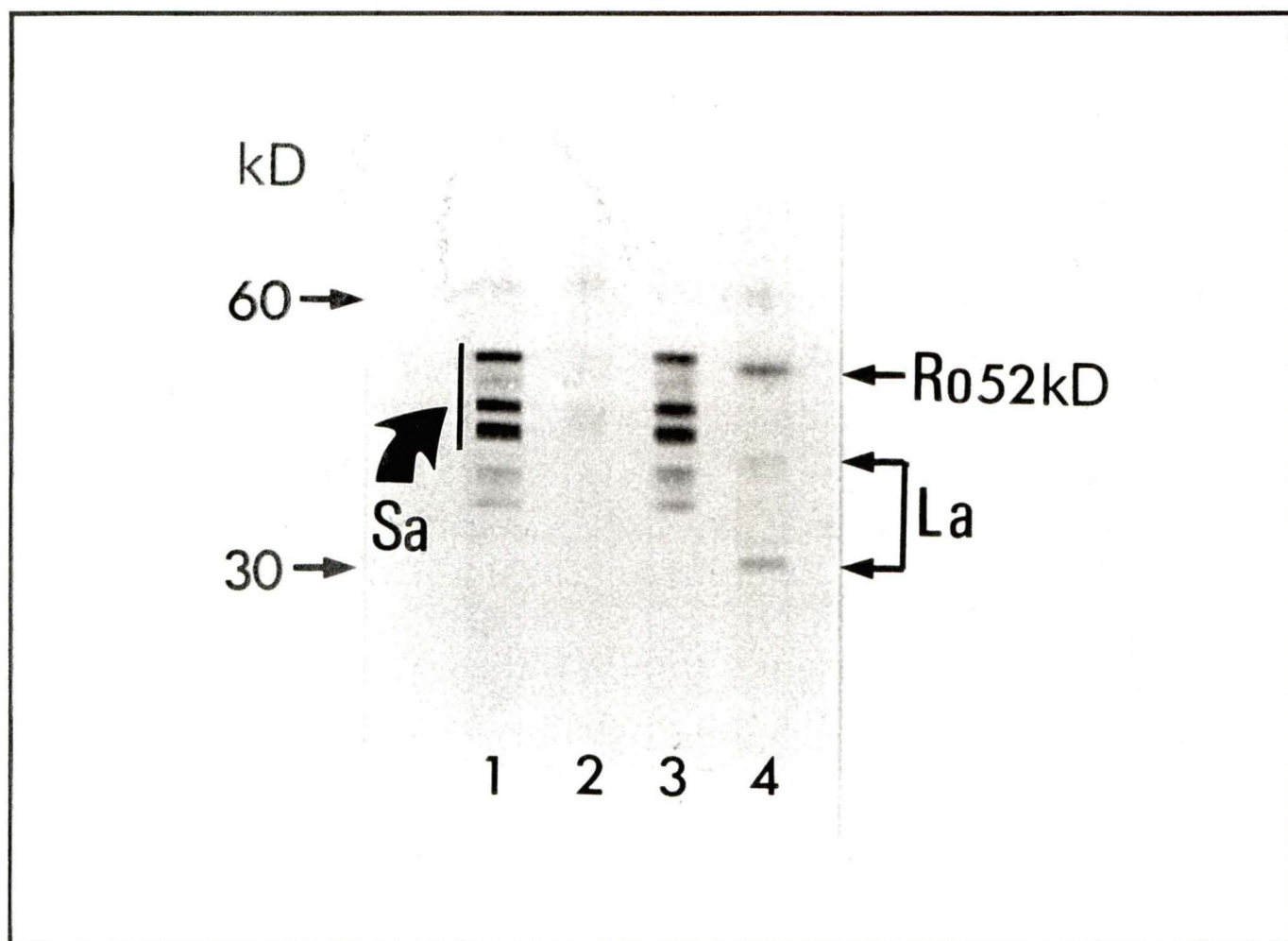


Figure 8: Criblage typique des anticorps anti-Sa dans les sérums de patients et de témoins par immunobuvardage avec un EPH semi-purifié. La membrane de nitrocellulose a été incubée avec 25 sérums de patients différents: un sérum normal (ligne 25), un sérum témoin anti-Sa positif (ligne 24) utilisé également à la ligne 3 de la figure 7 et 23 échantillons sériques provenant de patients dont la spécificité est inconnue (lignes 1–23). Les échantillons ont été testés à la dilution 1/50. Les lignes 8–10, 12, 14, 19, 22 et 23 reconnaissent l'antigène Sa avec un patron de liaison reproductible et comparable au sérum témoin anti-Sa. L'ensemble des sérums positifs provient de patients rhumatoïdes. Les échantillons proviennent de patients atteints d'ostéoporose (ligne 1), d'arthrose (lignes 2, 3, 5, 13 et 17), de spondylarthropathies séronégatives (lignes 4 et 11), de polyarthrites rhumatoïdes anti-Sa négatives (lignes 6, 15, 16, 18 et 21) et de polyarthralgies non spécifiques (lignes 7 et 20).

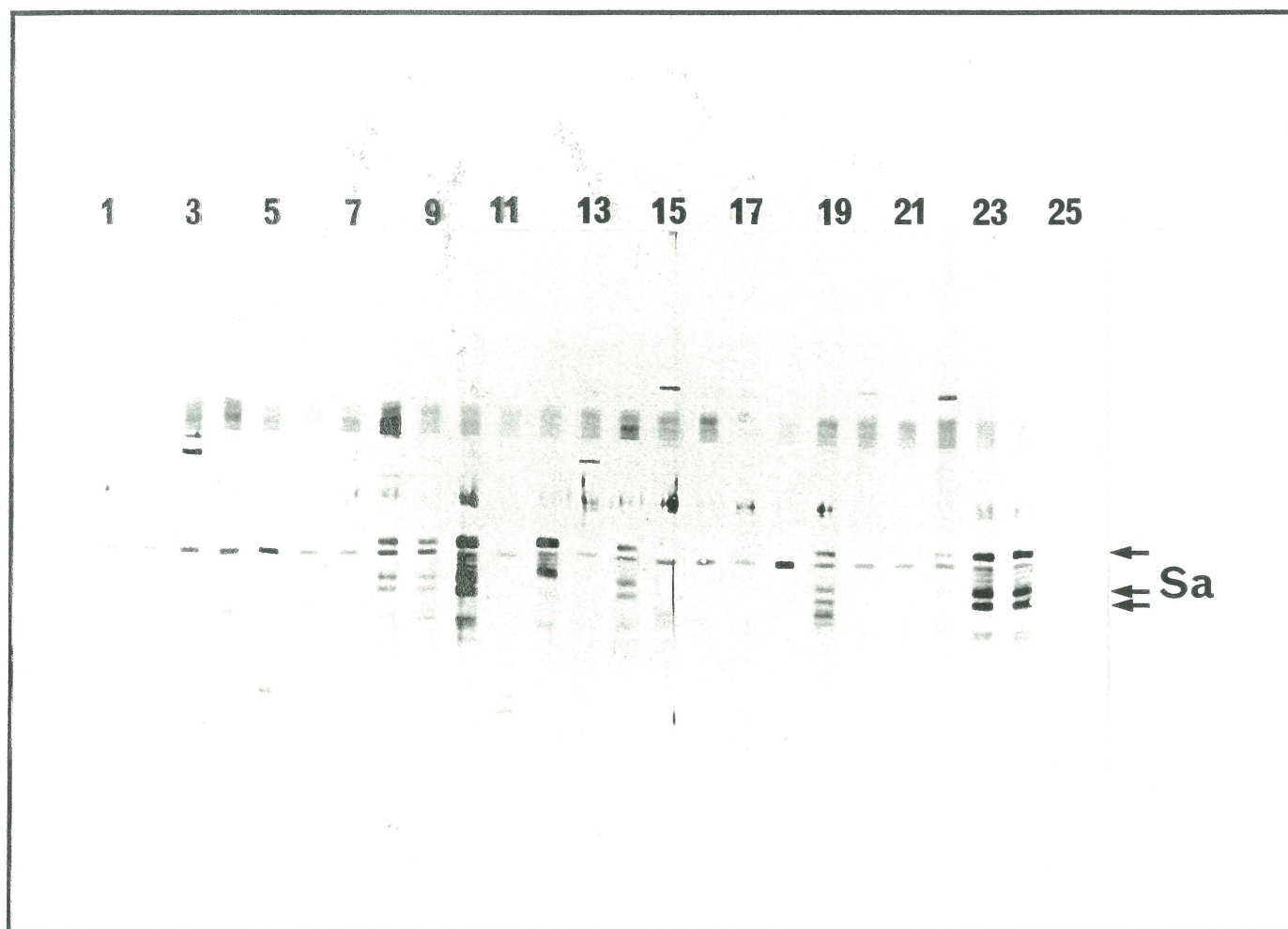


Figure 9: Détection spécifique de l'antigène Sa en immunobuvardage dans un extrait semi-purifié de tissu synovial rhumatoïde. L'ESH séparé par SDS-PAGE et transféré sur nitrocellulose a été incubé avec le sérum d'un individu normal (ligne 1), le sérum anti-Sa original (ligne 2), le sérum d'un patient lupique anti-SS-A(Ro) (ligne 3) et le sérum d'un patient rhumatoïde anti-Sa identifié sur les extraits de rate et de placenta (ligne 4). Le patron de liaison est constitué de deux bandes polypeptidiques majeures dont la bande de faible poids moléculaire est formé d'un doublet rapproché.

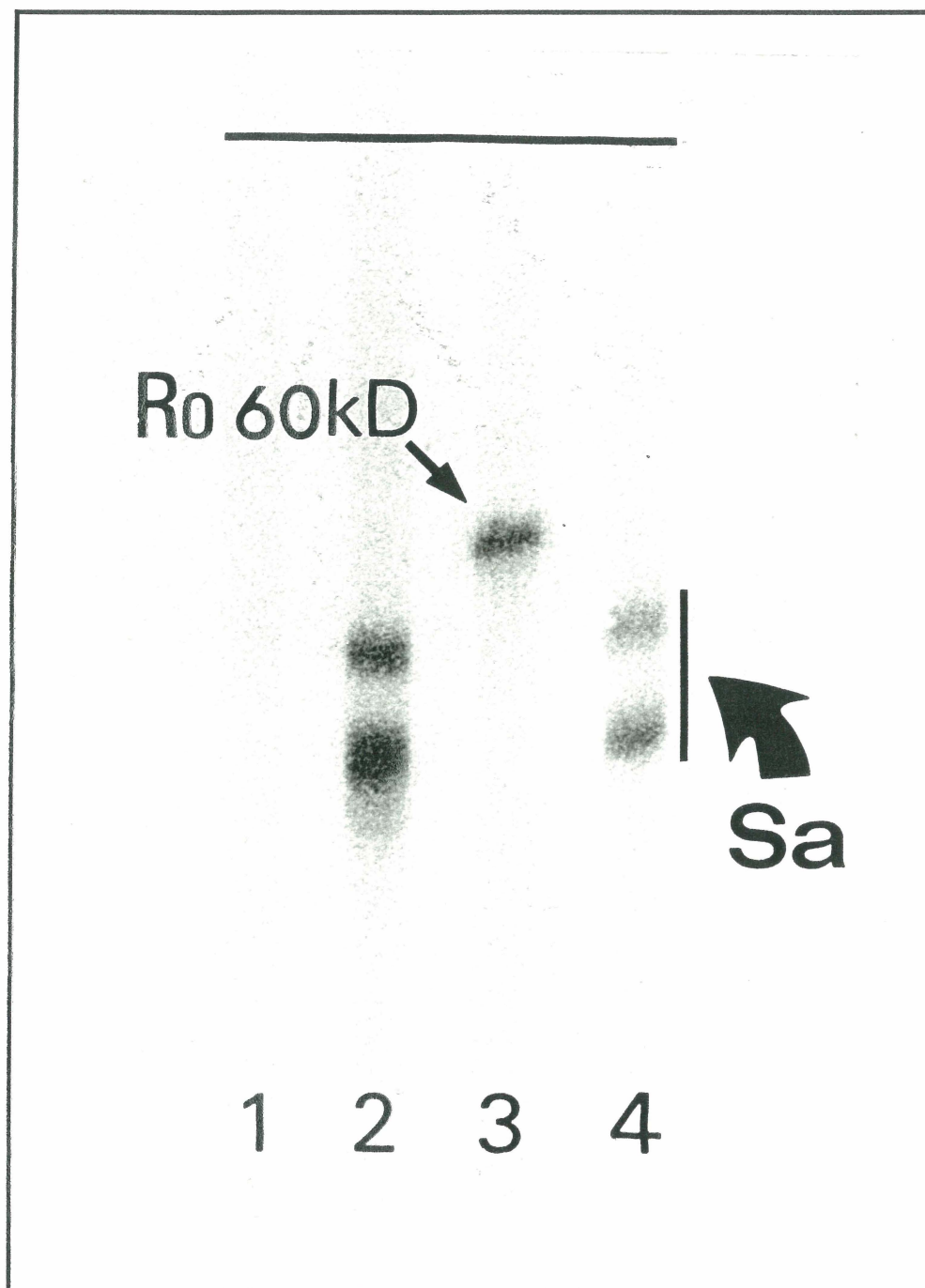


Figure 10: Réactivité croisée de l'antigène Sa dans les extraits de rate, de synoviale et de placenta humains. Les extraits de rate (à gauche), de synoviale (au centre) et de placenta (à droite) semi-purifiés ont été transférés sur nitrocellulose puis incubés avec les anticorps suivants: un sérum normal (ligne 1), un sérum anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne 2), un sérum rhumatoïde anti-Sa (ligne 3), des anticorps anti-Sa purifiés par affinité à partir d'une membrane de nitrocellulose contenant l'ERH (ligne 4) ou l'EPH (ligne 5) en utilisant le sérum de la ligne 3. Ces anticorps anti-Sa purifiés ont été isolés à partir de la bande de 50 kD de l'ERH ou des deux bandes majeures de 50 et 53 kD de l'EPH.

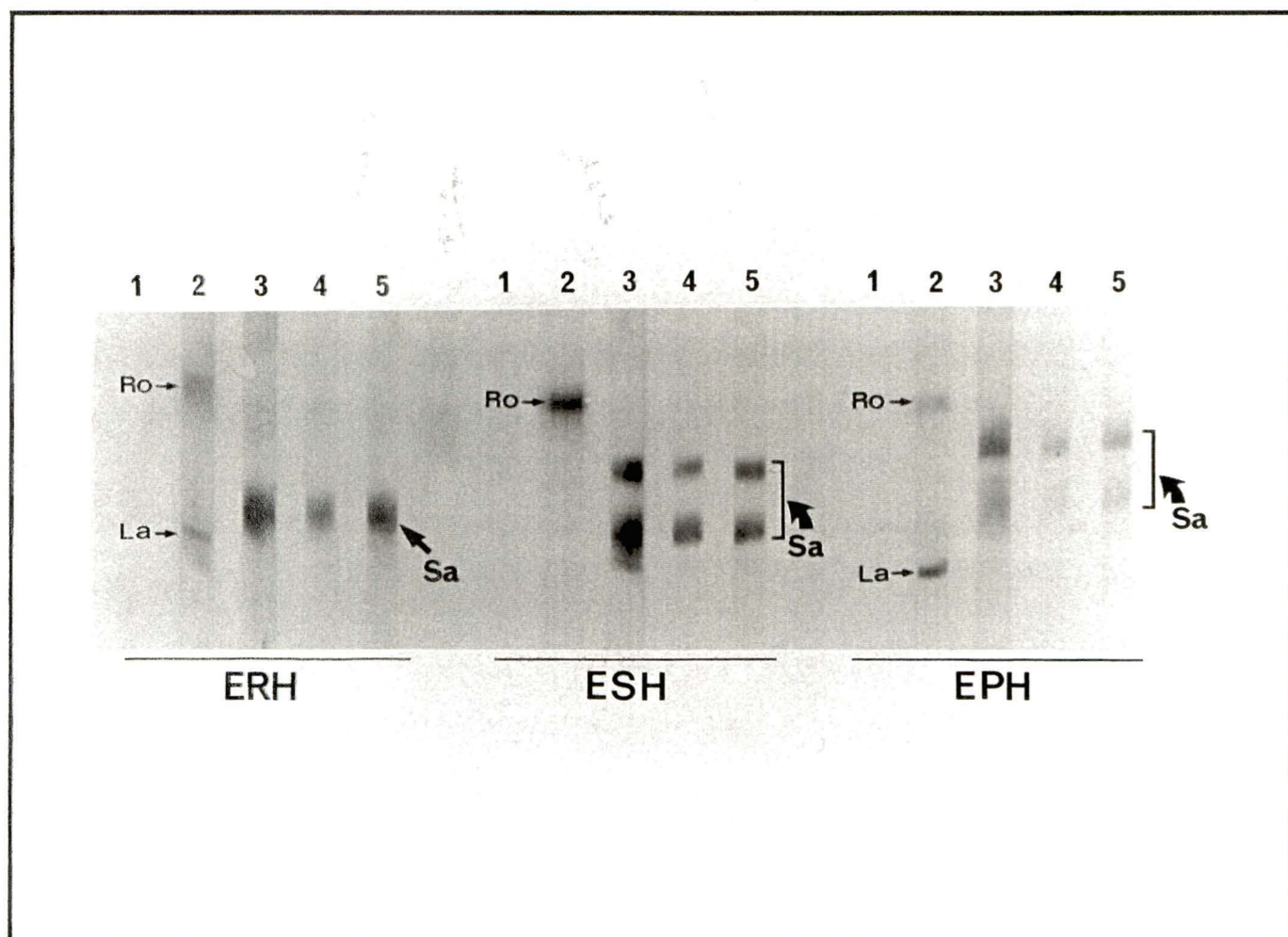
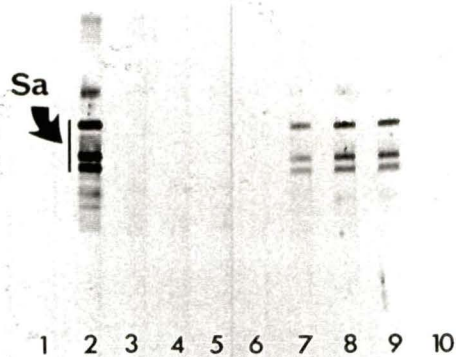


Figure 11: Détection par immunobuvardage des anticorps anti-Sa dans les prélèvements de liquides synoviaux. L'EPH séparé par SDS-PAGE et transféré sur nitrocellulose (section A) a été incubé avec un sérum normal (ligne 1), un sérum rhumatoïde anti-Sa (ligne 2) et 7 liquides synoviaux provenant de patients différents (lignes 3–10). Ces liquides ont été testés à la dilution 1/50. Les lignes 7 à 9 reconnaissent spécifiquement l'antigène Sa placentaire. Ces trois prélèvements synoviaux proviennent de patients rhumatoïdes anti-Sa positifs au niveau sérique. Comparativement, l'ESH (section B) a été incubé avec un sérum normal (ligne 1), un sérum anti-Sa témoin (ligne 2) et les liquides synoviaux des lignes 8 et 9 de la section A (lignes 3 et 4). Ces deux prélèvements détectent l'antigène Sa de façon reproductible et selon le même patron de liaison dans les deux extraits.

(A)



(B)



Figure 12: Caractérisation isotypique des anticorps anti-Sa par immunbuvardage. L'ERH séparé et transféré sur nitrocellulose a été incubé en duplicata avec un sérum normal (ligne 1), un sérum anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne 2) et 12 sérums de patients rhumatoïdes anti-Sa positifs (lignes 3-8) et anti-Sa négatifs (lignes 9-14). Les anticorps liés à la membrane ont été détectés à l'aide d'un anticorps secondaire anti-IgM (section A) ou anti-IgG (section B). Seul les sérums des lignes 4 et 5 ont des anticorps anti-Sa d'isotype IgM (section A). Les anticorps anti-Sa d'isotype IgG sont détectés dans les lignes 3 à 8 (section B).

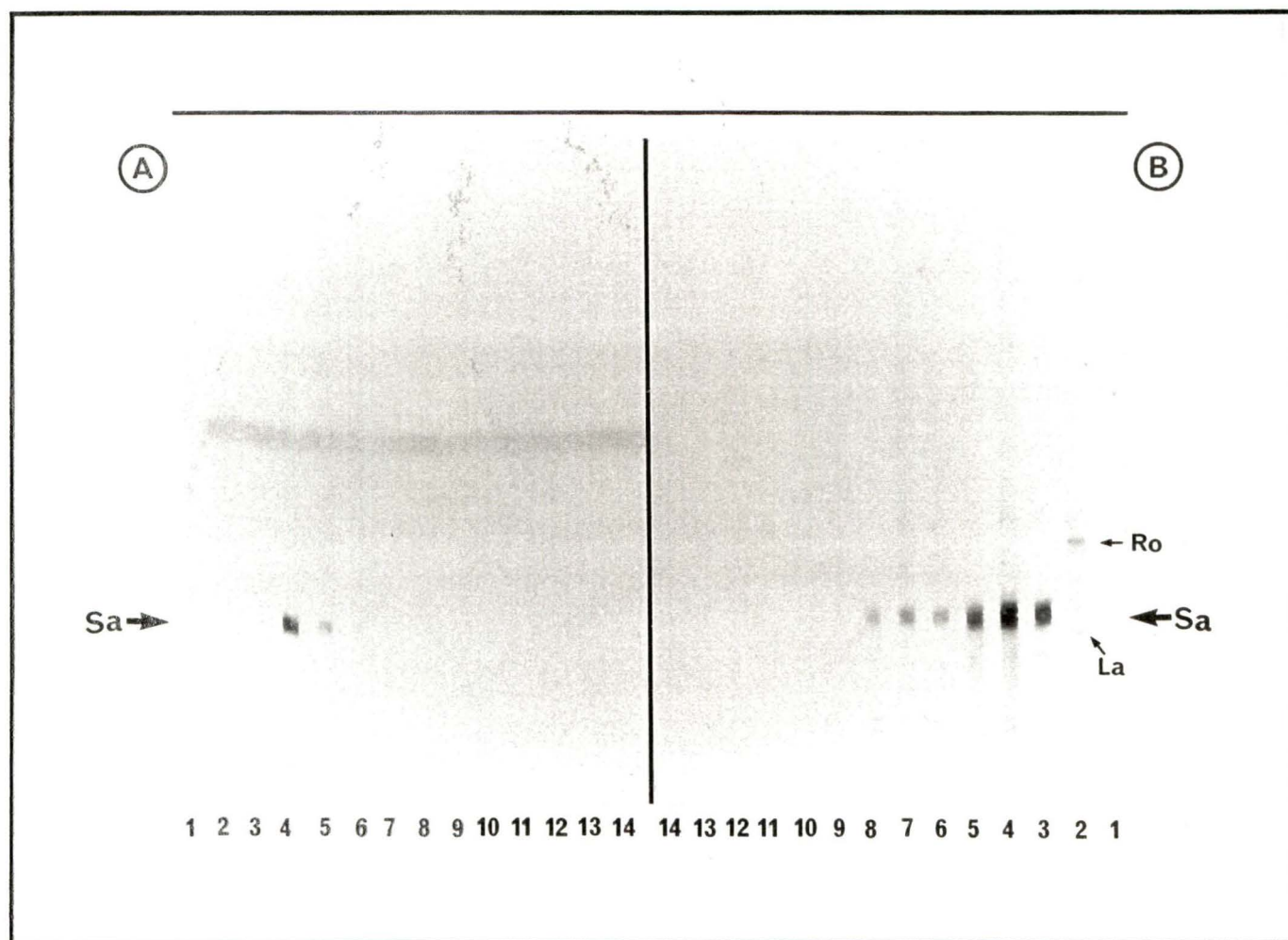


Figure 13: Les anticorps anti-Sa ne sont pas associés au facteur rhumatoïde.

L'ERH transféré sur membrane de nitrocellulose a été incubé avec divers sérums ou avec des anticorps purifiés par affinité: un sérum lupique FR fortement positif (1600 U.I/ml) (ligne 1), des anticorps anti-Sa purifiés par affinité (ligne 2), du facteur rhumatoïde IgG/anti-IgG purifié (ligne 3), un sérum normal (ligne 4), des sérums rhumatoïdes anti-Sa (lignes 5 et 6) et un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne 7). En parallèle, la forme réduite de l'IgG humaine (IgGh) révélée avec un sérum de chèvre anti-IgG (Fc) humaine. Le complexe IgG/anti-IgG migre à une position différente du polypeptide Sa de 50 kD. Malgré l'impossibilité de se lier à l'IgG sous sa forme réduite, le sérum contenant un titre élevé de FR ne détecte aucune bande spécifique.

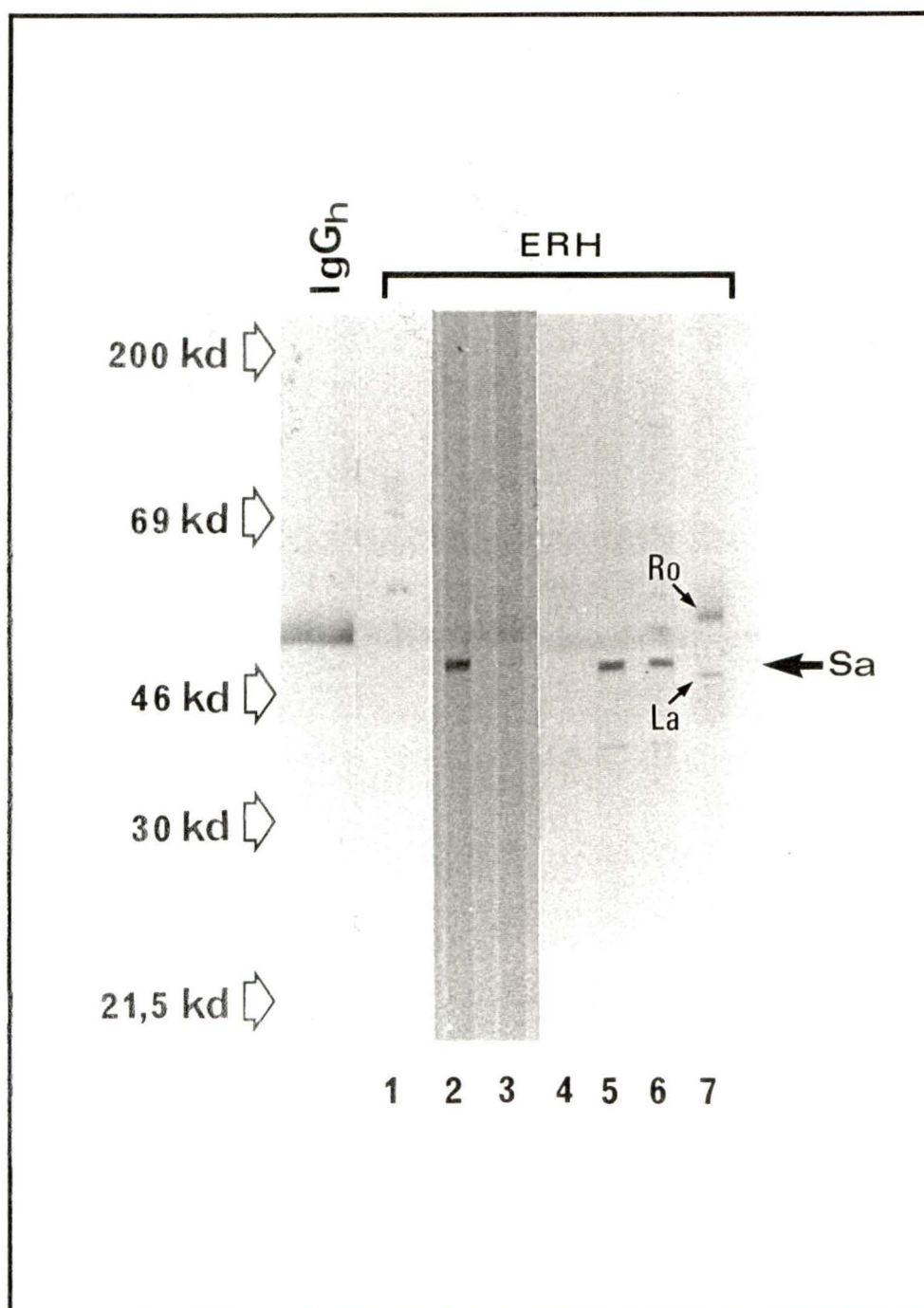
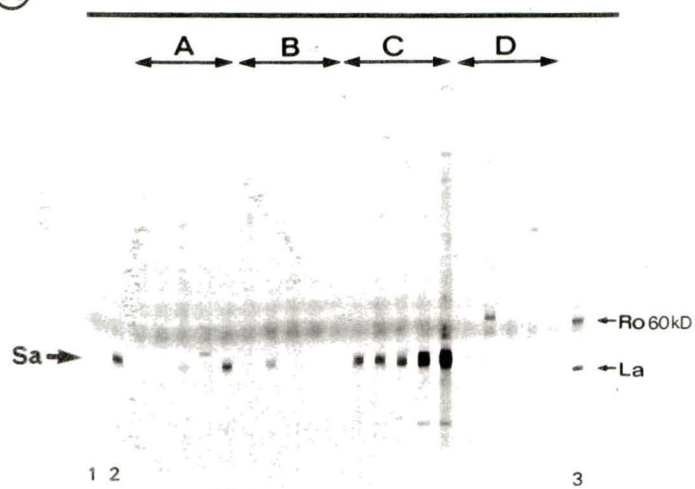


Figure 14: Analyse comparative entre le système Sa et l'antigène RA33. L'ERH a été séparé et transféré sur nitrocellulose afin de détecter les anticorps anti-Sa (section A). La membrane a été incubée avec 4 groupes de sérums rhumatoïdes différents: 5 sérums anti-RA33 positifs (A), 5 sérums anti-RA33 négatifs (B), 5 sérums anti-Sa positifs (C) et 5 sérums anti-Sa négatifs (D). Un sérum anti-RA33 positif est faiblement anti-Sa positif, tandis que deux sérums anti-RA33 négatifs sont significativement anti-Sa positifs. Comme témoins, un sérum normal (ligne 1), un sérum anti-Sa (ligne 2) et un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne 3) ont été utilisés. Parallèlement, un extrait nucléaire de cellules HeLa riche en RA33 a été séparé et transféré selon les mêmes conditions qu'à la section A, afin d'identifier le système RA33 (section B). Les mêmes groupes de sérums (A, B, C et D) ont été utilisés. Aucun des sérums anti-Sa positifs ou négatifs ne reconnaît l'antigène RA33. Les témoins utilisés dans cette section sont: un sérum normal (ligne 1), un sérum anti-RA33 négatif (ligne 2) et positif (ligne 3).

Ⓐ



Ⓑ

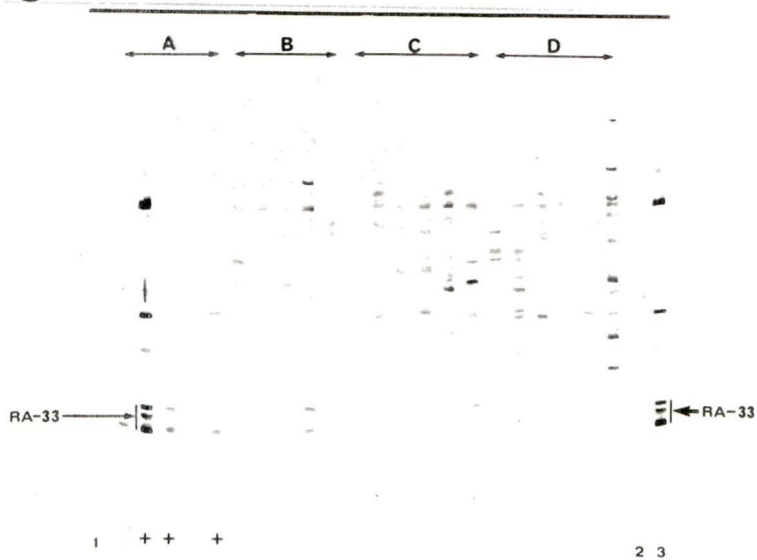


Figure 15: Analyse comparative entre les anticorps anti-EBNA et anti-Sa. Les extraits de rate (ERH), de cellules BL41 infectées par le virus EBV (BL41/B95.8 et BL41/P3HR-1) de même que de cellules BL41 non infectées ont été séparés et transférés sur nitrocellulose puis incubés avec différentes sources d'anticorps: un sérum normal (ligne 1), un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne 2), des sérums rhumatoïdes anti-Sa (lignes 3 et 4), un pool de sérum de patients atteints de mononucléose infectieuse positifs pour les ANEB-1 et -2 (ligne 5), un sérum anti-Sa absorbé avec un extrait de cellules BL41/B95.8 (ligne 6), le pool de sérum de la ligne 5 absorbé avec un extrait de cellules BL41/B95.8 (ligne 7) ou avec un extrait de cellules BL41/P3HR-1 (ligne 8) et des anticorps anti-Sa purifiés par affinité (ligne 9).

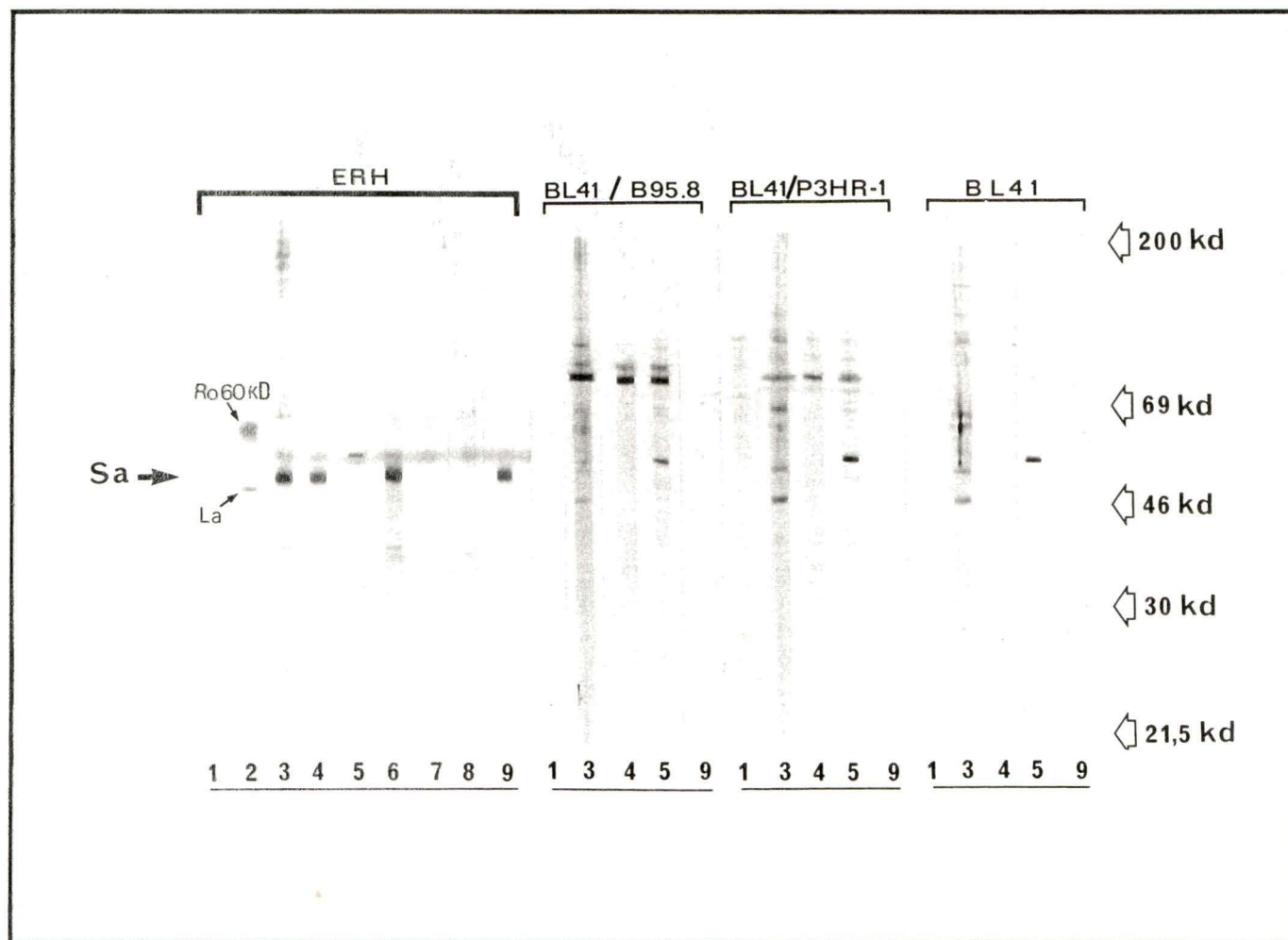


Figure 16: Les anticorps anti-Sa ne sont pas dirigés contre des composantes du cartilage articulaire. Un extrait semi-purifié de placenta (A et D) et des extraits purifiés de cartilage articulaire humain (B) et canin (C) ont été séparés par SDS-PAGE puis transférés sur membrane de nitrocellulose dans le but d'être analysés en immunobuvardage. La membrane a été incubée avec un sérum normal humain (ligne a), des sérums rhumatoïdes anti-Sa (ligne b), un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne c) et un sérum polyclonal de lapin anti-collagènes (ligne d). Les sérums anti-Sa ne reconnaissent aucune bande spécifique dans les deux extraits de cartilage articulaire. De plus, les anticorps anti-collagènes ne détectent pas de bande dans l'EPH. À la ligne a) de la section B, la liaison non spécifique du sérum normal semble être le résultat d'une concentration excessive de protéines dans le gel. Cette liaison non spécifique s'étend également sur l'ensemble de l'extrait de cartilage articulaire humain (section B).

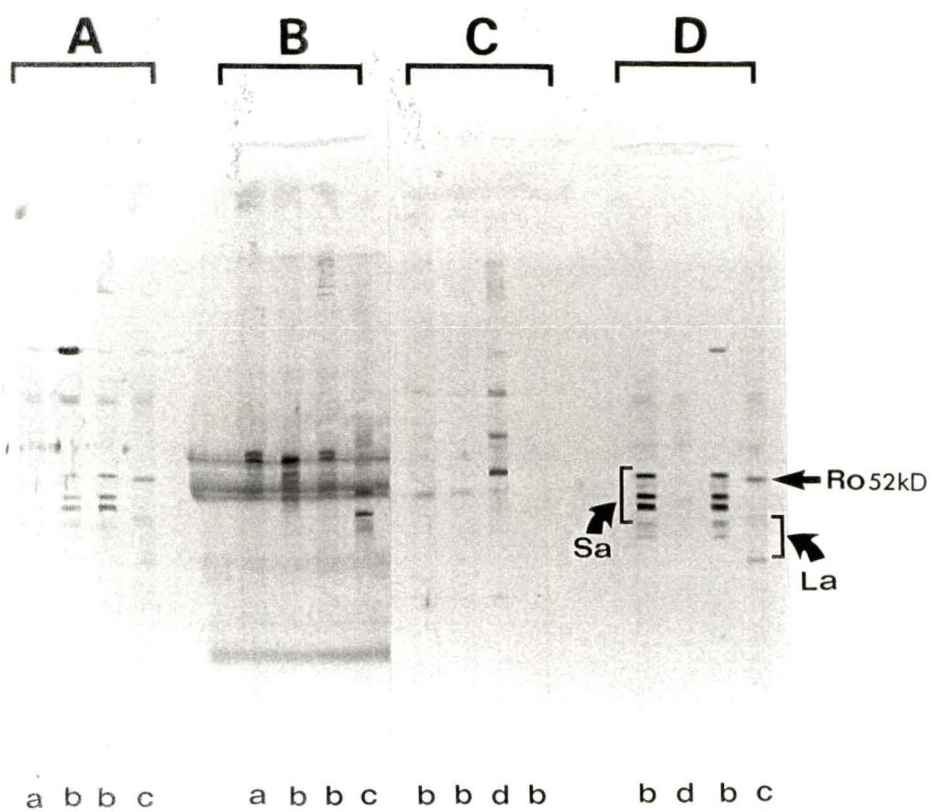


Figure 17: Caractérisation immunochimique de l'antigène Sa provenant d'espèces différentes. Des extraits semi-purifiés de placenta humain (A) et bovin (B) ont été analysés en immunobuvardage avec un sérum normal (ligne 1), un sérum de patient lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (ligne 2), un sérum rhumatoïde anti-Sa (ligne 3) et des anticorps anti-Sa purifiés par affinité à partir d'une membrane contenant l'EPH (ligne 4). Le sérum anti-Ro/La détecte uniquement le système SS-B(La) de 48 et 35 kD (section B, ligne 2). Les anticorps anti-Sa purifiés reconnaissent l'antigène Sa bovin, mais avec un signal beaucoup plus faible.

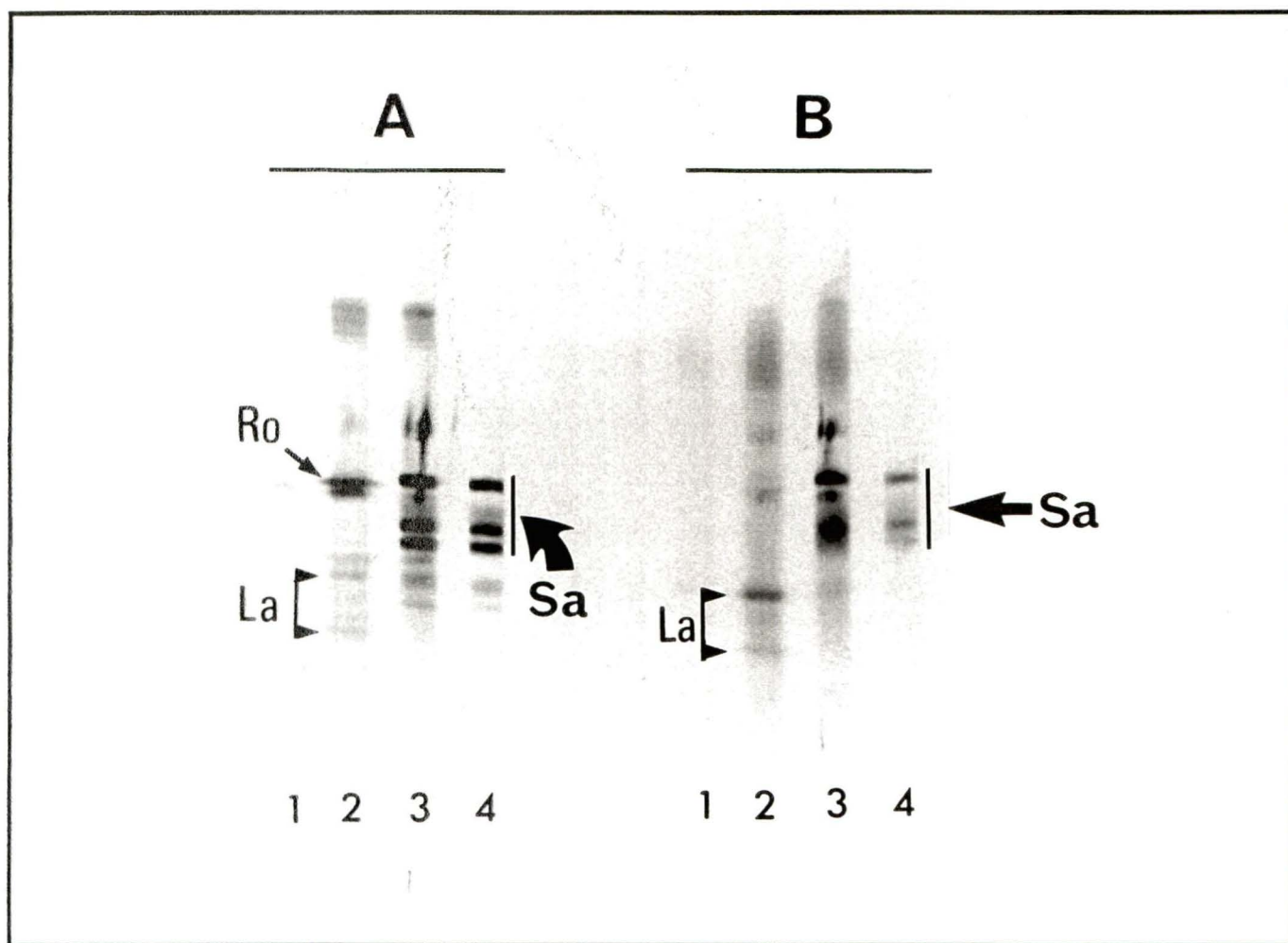


Figure 18: Purification par HPLC et détection de l'antigène Sa isolé du placenta humain. À la section A, l'EPH semi-purifié (250 mg) a été chargé sur une colonne d'échange d'anions (DEAE-15HR) et élué avec un gradient de 120 à 300 mM de NaCl durant 120 minutes (pointillés). Des fractions de 2 ml (en abscisse) ont été collectées au cours de l'élution. Les fractions collectées ont par la suite été analysées en ELISA avec un sérum anti-Sa dilué 1/2000 (pointillés en rouge). La densité optique (D.O.) obtenue à 450 nm (en ordonnée, à droite) est optimale au niveau des fractions 25 à 29. À la section B, les protéines des différentes fractions (combinées par 3) ont été précipitées et analysées en immunobuvardage avec un sérum anti-Sa dilué 1/50. Les fractions 25 à 27 (ligne 9) sont particulièrement enrichies en antigène Sa (*). Comme témoin, un EPH semi-purifié (à gauche) incubé avec le même sérum a été utilisé.

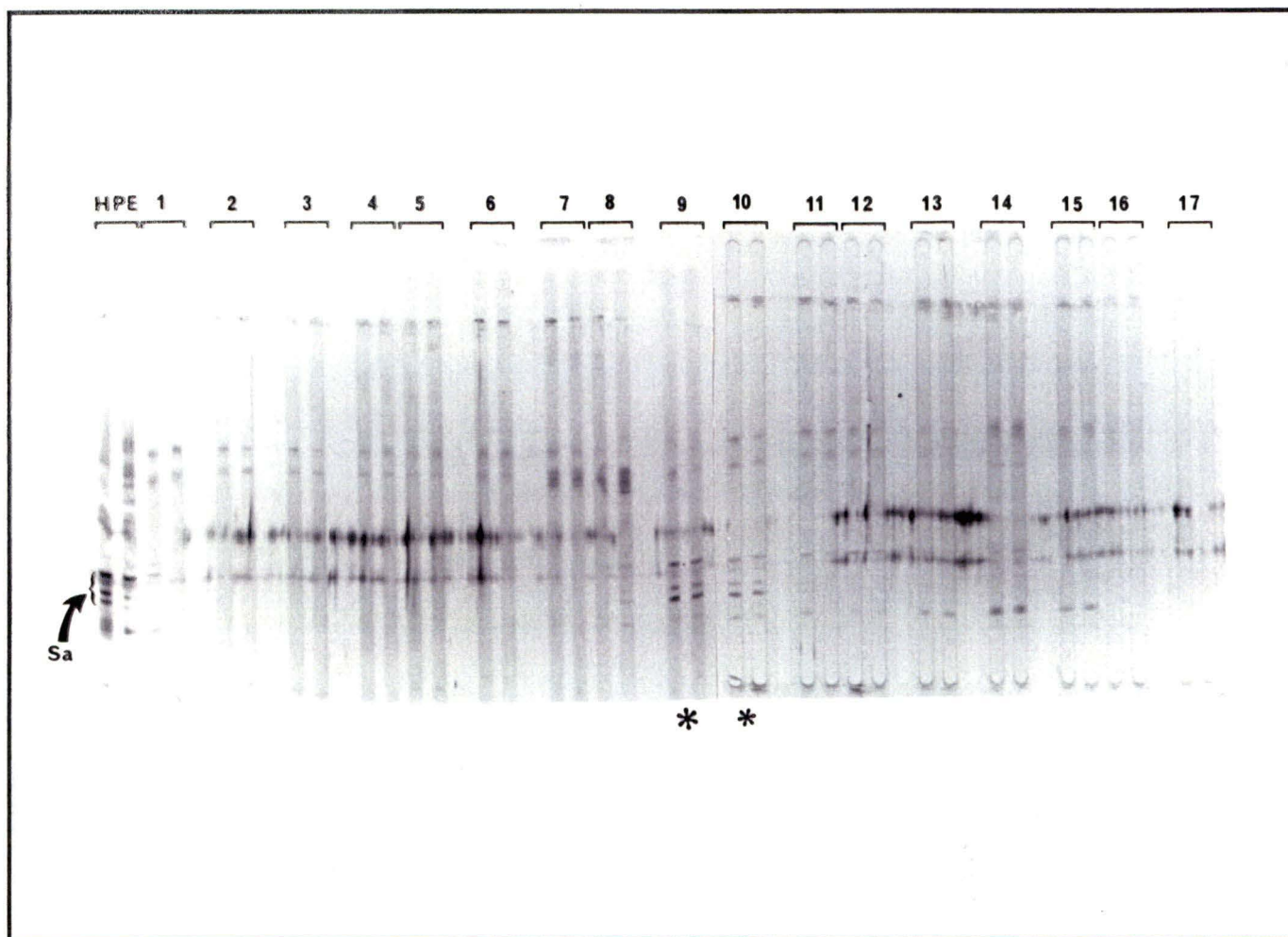
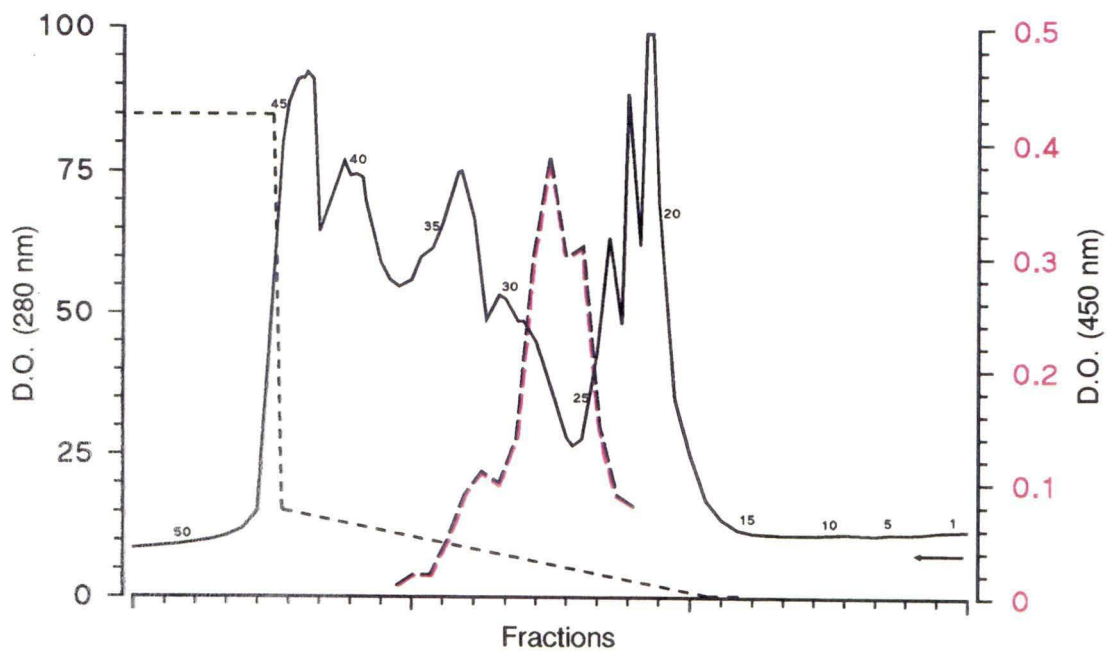


Figure 19: Analyse de l'EPH purifié par HPLC. Les fractions 25 à 27 enrichies en Sa, obtenues sur gradient de NaCl par chromatographie d'échange d'anions, ont été analysées en SDS-PAGE (B) et en immunobuvardage (A). Un échantillon protéique a été séparé par SDS-PAGE avec des conditions permettant une meilleure résolution (grand gel, et voltage plus faible) et coloré à l'argent (ligne B). Un échantillon en parallèle a été séparé et transféré sur nitrocellulose, puis incubé avec un sérum anti-Sa dilué 1/50. Les bandes polypeptidiques 1, 2 et 3 qui correspondent à l'antigène Sa ont un poids moléculaire approximatif de 53, 50 et 49 kD respectivement.

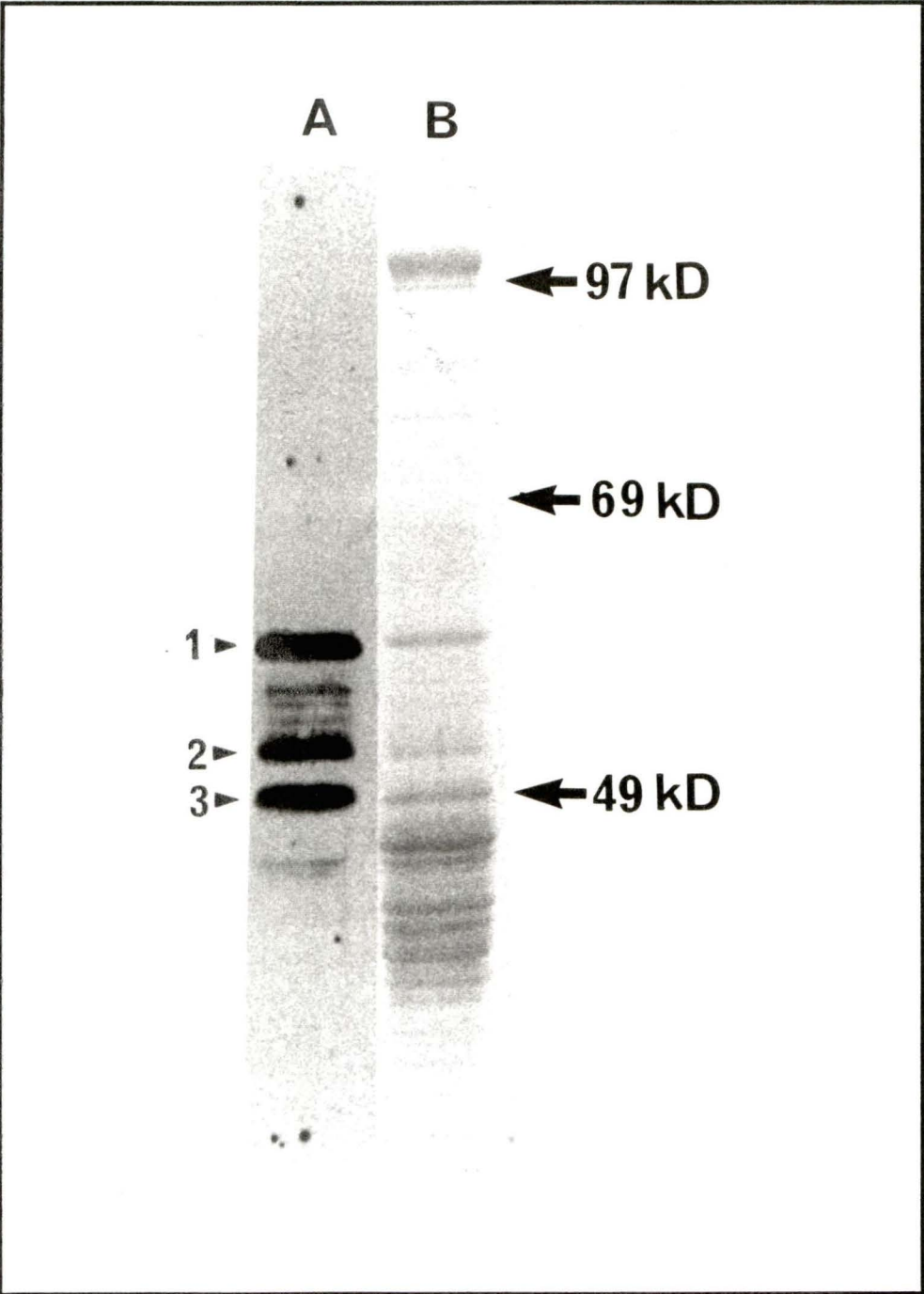
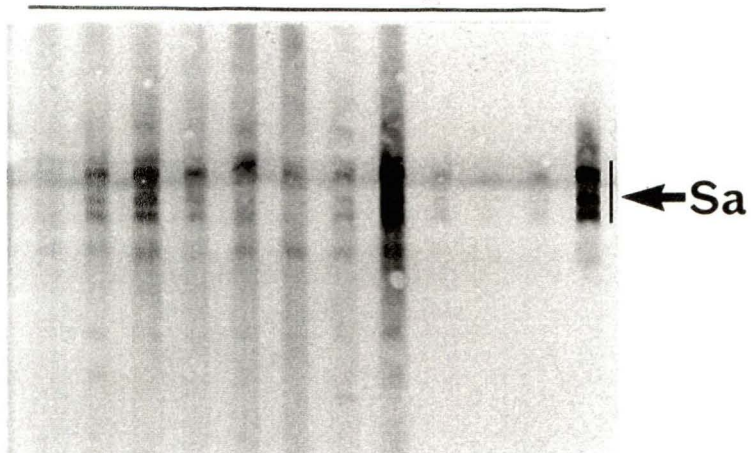


Figure 20: Analyse comparative des anticorps anti-Sa et anti-vimentine en immunobuvardage. Un EPH (section A) et de la vimentine purifiée (section B) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur nitrocellulose. Les membranes ont été ensuite incubées avec des sources d'anticorps différentes: des sérums provenant de 8 sérums rhumatoïdes (lignes 1–11) et des anticorps anti-Sa purifiés par affinité (ligne 12). Les lignes 2, 3, 4 et 8 sont franchement anti-Sa positifs, tandis que les sérums des lignes 2, 5 et 8 sont positifs pour la vimentine. Le sérum incubé dans la ligne 3 est fortement Sa positif, mais négatif sur la vimentine. Les anti-Sa purifiés ne détectent pas la bande polypeptidique associé à la vimentine (section B, ligne 12).

(A)



(B)

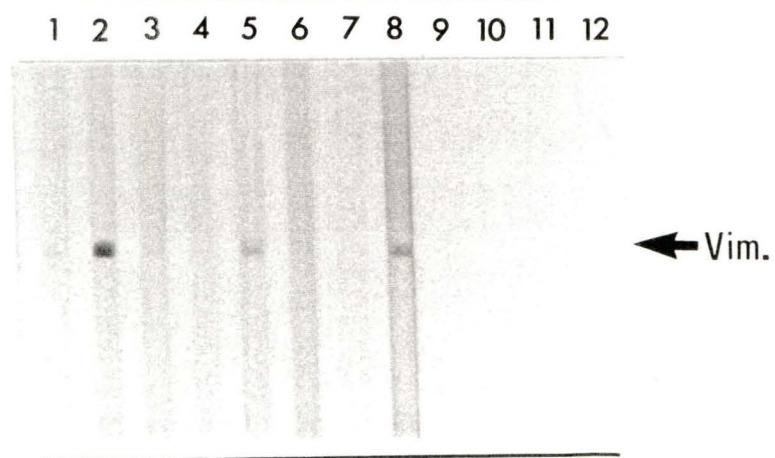


Figure 21: Absorptions des anticorps anti-Sa et anti-vimentine avec l'EPH ou avec la vimentine purifiée. L'EPH (section A) et la vimentine purifiée (section B) ont été transférés sur nitrocellulose, puis incubés avec un sérum rhumatoïde anti-Sa et anti-vimentine (ligne 1), le même sérum que celui incubé à la ligne 1 absorbé soit avec 5 mg d'EPH semi-purifié (ligne 2), avec 5 mg de vimentine purifiée (ligne 3) ou avec 10 mg de vimentine purifiée (ligne 4). Contrairement à la réactivité des anticorps anti-Sa, les anticorps anti-vimentine sont complètement inhibés par les absorptions avec la vimentine.

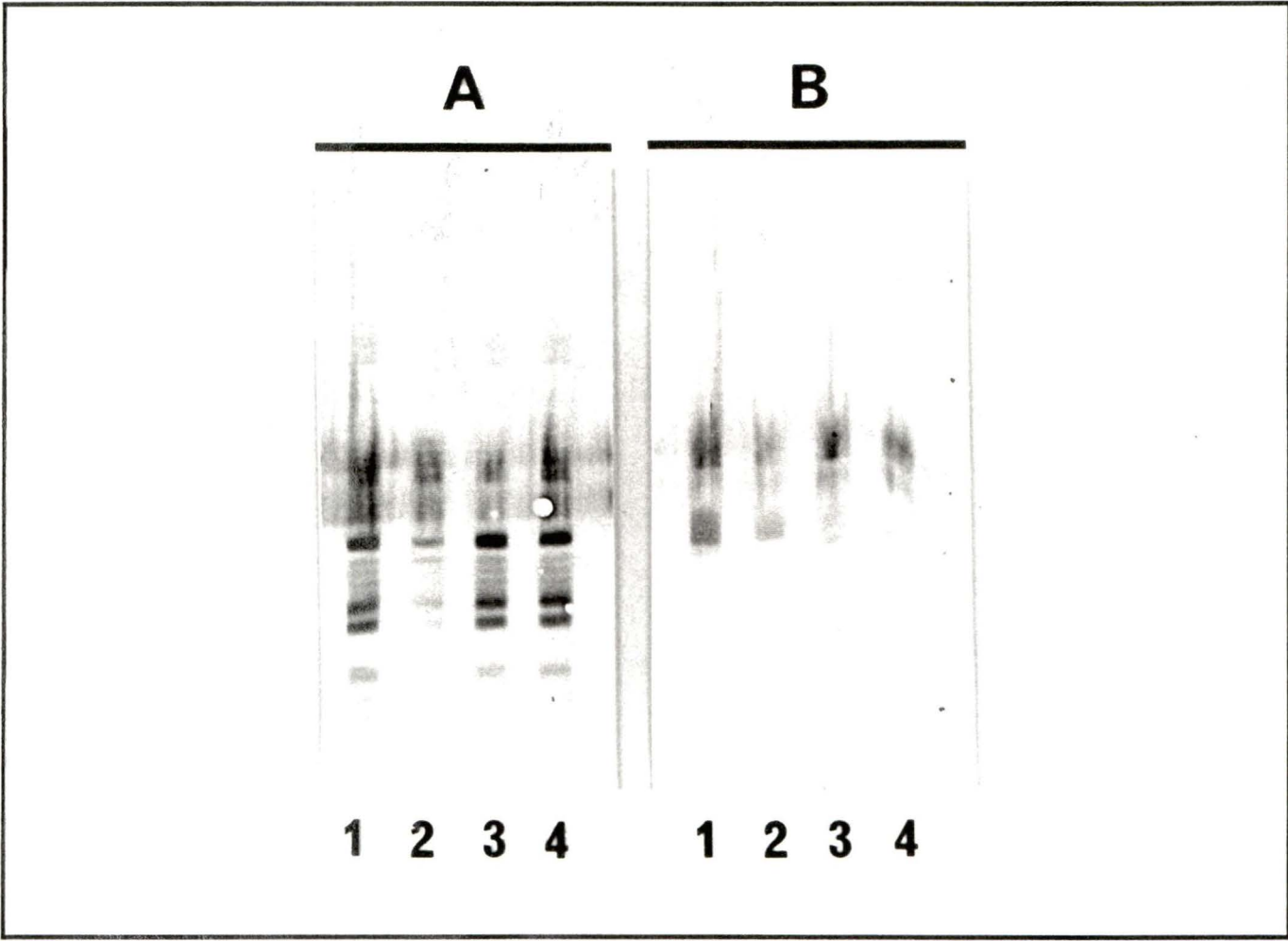
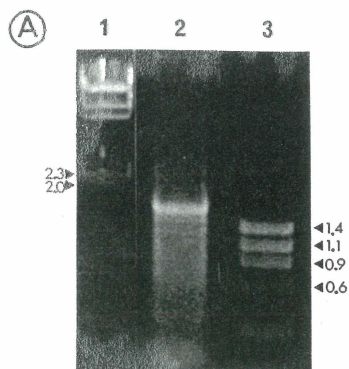


Figure 22: Isolement de l'ADNc de la PDI par PCR et analyse restrictive de la séquence de l'insert sous-cloné dans pUC19. Le produit de PCR analysé sur gel d'agarose révèle un fragment ayant une taille de 1540 pb correspondant à la pleine longueur de l'ADNc de la PDI (section A, ligne 2). Le fragment de 1540 pb a été sous-cloné au site Bam HI du vecteur de caractérisation pUC19 (section B). En raison de la séquence connue de la PDI, l'insert (positions 65 à 1605) possède trois sites de restriction correspondant à Pvu II. La digestion du plasmide PDI/pUC19 avec Bam HI entraîne deux fragments correspondant au vecteur (2686 pb) et à l'insert (1540 pb) (section C, ligne 2). La séquence de la PDI est partiellement confirmée par la digestion simultanée avec Bam HI et Pvu II, produisant 7 fragments (2364, 850, 365, 266, 211, 111 et 81 pb) (section C, ligne 3) correspondant à ceux estimés à la section B. Le λ Hind III (ligne 1) et le ϕ X174 Hae III (section A, ligne 3 et section C, ligne 4) ont été utilisés comme marqueurs de poids moléculaires. La taille des différents fragments est exprimée en kilobases.



(B)

Plasmide contenant l'ADNc de la PDI

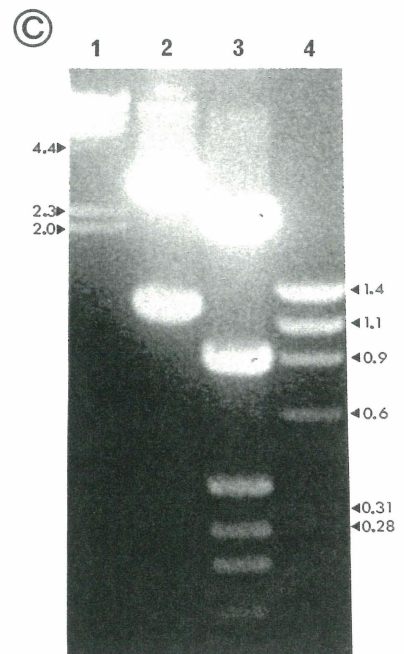
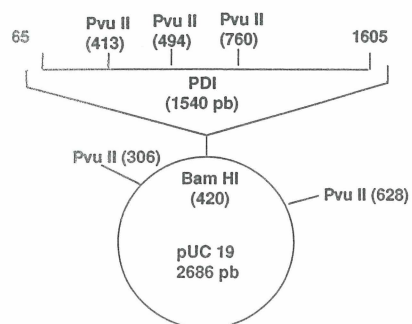
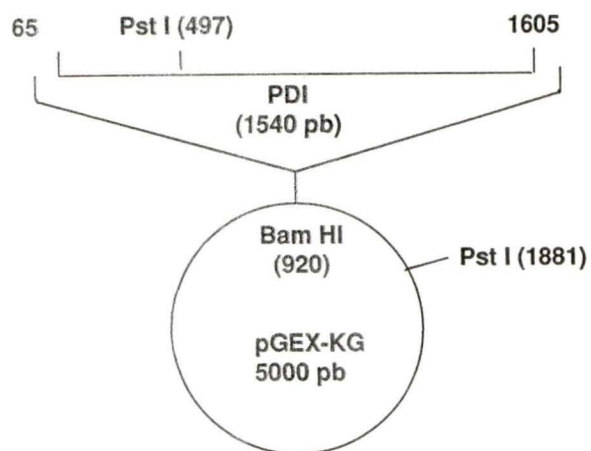


Figure 23: Analyse sur gel d'agarose de l'orientation de l'ADNc de la PDI dans le vecteur pGEX-KG via le site de restriction Pst I. Le fragment d'ADNc correspondant à la PDI a été sous-cloné au site Bam HI du vecteur d'expression pGEX-KG (section A). Le cadre de lecture a été respecté. L'orientation de l'insert a été confirmée par la digestion du plasmide avec Pst I résultant en deux fragments (4471 et 2069 pb) (section B, ligne 3). Ceux-ci correspondent à ceux estimés dans la section A. La digestion du plasmide par Bam HI donne deux fragments de 5000 et 1540 pb correspondant au vecteur et à l'insert, respectivement (section B, ligne 2). Le λ Hind III (ligne 1) et le ϕ X174 Hae III (ligne 4) ont été utilisés comme marqueurs de poids moléculaires (kb).

(A)



Orientation sens: 4471 et 2069 pb

(B)

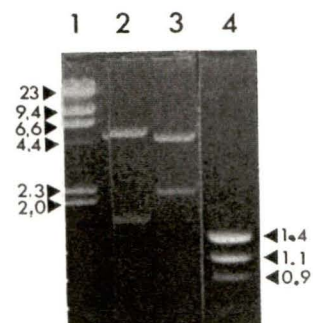
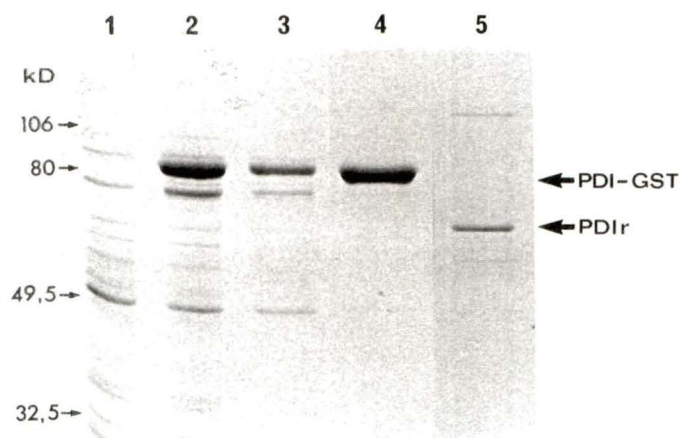


Figure 24: Purification de la PDI recombinante exprimée dans le vecteur pGEX-KG analysée par SDS-PAGE (A) et détection des anticorps anti-PDI par immunobuvardage (B). La protéine recombinante a été induite à partir de bactéries *E. coli* PR745 *lon*⁻ transformées avec le plasmide PDI/pGEX-KG, purifiée sur colonne de Sépharose 4B et clivée par la thrombine tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les lysats bactériens ou les fractions purifiées de protéines ont été séparés par SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie (section A). Les échantillons protéiques séparés sont: le lysat total de bactéries transformées avec PDI/pGEX-KG avant (ligne 1) et après (ligne 2) l'induction de la protéine de fusion GST-PDI; la fraction soluble du sonicat de bactéries transformées après induction (ligne 3); la GST-PDI purifiée (ligne 4); et la PDIr obtenue après clivage à la thrombine (ligne 5). L'immunobuvardage avec la PDIr (section B) a été effectué en utilisant 10 échantillons sériques différents: 5 sérums anti-Sa positifs (lignes 1-5), 4 sérums de patients souffrant d'arthrose (lignes 6-9) et un sérum normal (ligne 10). Les lignes 1, 3, 4, 6, 7 et 9 sont considérées anti-PDIr positifs.

Ⓐ



Ⓑ

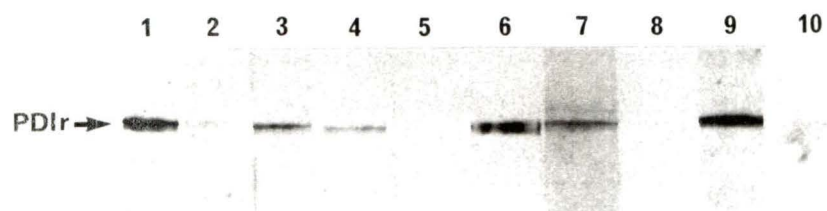


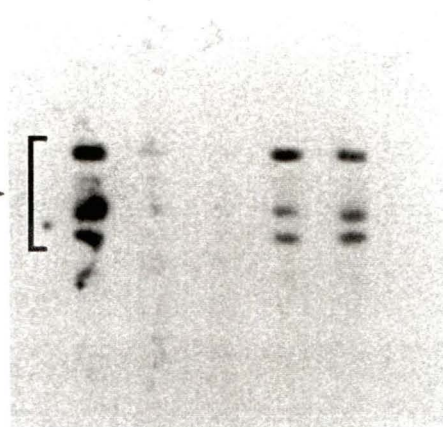
Figure 25: Analyse en immunobuvardage de sérums anti-Sa et anti-PDI absorbés avec l'EPH ou avec la GST-PDI. L'EPH (section A) et la GST-PDI (section B) ont été transférés sur nitrocellulose et incubés avec un sérum anti-Sa et anti-PDI positif n'ayant pas été absorbé (ligne 1), ou ayant été absorbé soit avec 5 mg (ligne 2) ou 10 mg (ligne 3) d'EPH semi-purifié, ou avec 500 µg (ligne 4) ou 1 mg (ligne 5) de GST-PDI.

Ⓐ

1 2 3 4 5

Sa →

[



Ⓑ

1 2 3 4 5

PDI →

[

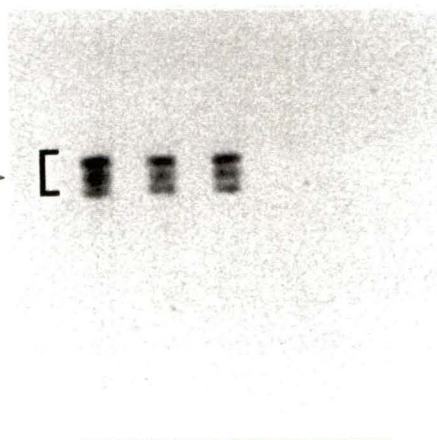


Figure 26: Fluctuation des anticorps anti-Sa à travers le temps et tout au long de l'activité de la maladie. L'ERH séparé et transféré sur nitrocellulose a été incubé avec des prélèvements sériques de la patiente SC (lignes 1–12). Ces échantillons ont été prélevés avant la maladie (lignes 1 et 2), au début de la maladie (ligne 3) et durant le traitement (lignes 4–12). Les anticorps anti-Sa ne sont pas détectés avant le début de la synovite, puis apparaissent rapidement avec les manifestations rhumatoïdes et les titres chutent progressivement après traitement. Comme témoins, un sérum normal (NHS), un sérum lupique anti-SS-A(Ro) et anti-SS-B(La) (Ro/La), un sérum anti-SS-A(Ro) et deux sérums témoins anti-Sa (+) ont été utilisés.

NHS
Ro/La
Ro
09-85
09-86
03-87
09-87
12-87
03-88
06-88
11-88
02-89
11-89
02-90
09-90
+s
a
+

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

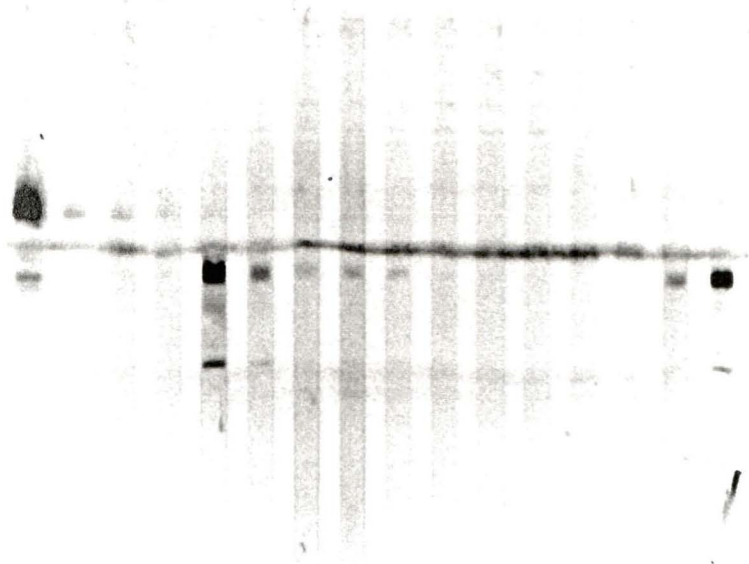
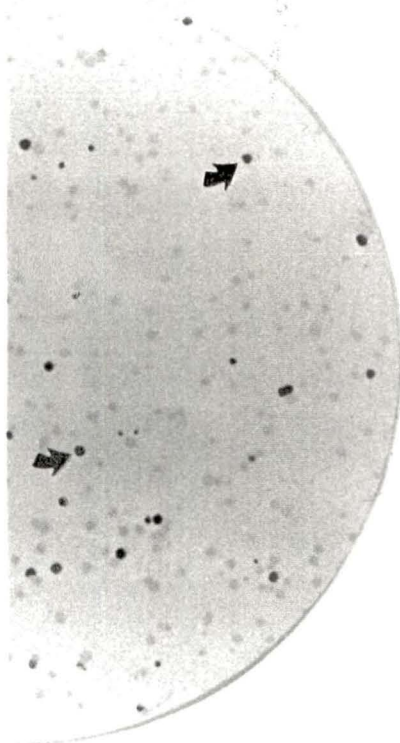


Figure 27: Détection et isolement du clone d'ADNc à partir de la bibliothèque d'expression de placenta humain avec des sérums de patients rhumatoïdes. Après avoir identifié une protéine de fusion (β -gal-RA-1) immunoréactive avec les sérums de patients atteints de PR, le phage λ gt11 positif a été purifié sur Pétri et réincubé à l'étape secondaire avec le même mélange de sérums (section A). À cette étape de purification, la β -gal-RA-1 correspondant au clone positif a été fortement reconnue par les anticorps de patients, contrairement à ceux provenant de phages contaminants. Le clone λ gt11 positif a été purifié ultérieurement (en étape tertiaire) afin d'isoler l'ADNc codant pour la RA-1r (section B). À la suite de l'isolement de l'insert par digestion avec EcoRI, le fragment purifié et analysé sur gel d'agarose 1% migre à environ 950 pb (ligne 2). Les fragments de ϕ X174 Hae III ont été utilisés comme marqueurs de poids moléculaires (ligne 1).

Ⓐ



Ⓑ

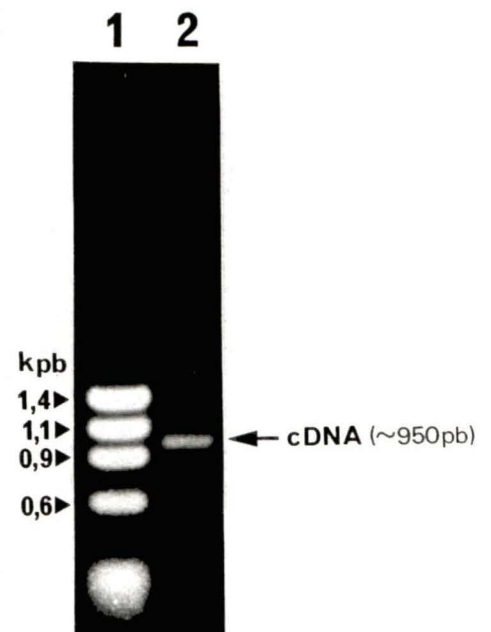


Figure 28: Séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour RA-1 et séquence peptidique correspondante. La séquence d'ADN se rapporte à la première ligne et la séquence d'acides aminés se rapporte à la deuxième. Les numéros inscrits à l'extrême droite de chacune des lignes correspondent aux positions nucléotidiques ou d'acide aminés telles que fournies par la banque de données *GenBank/EMBL*, sous le code d'accès M86258. La séquence d'acides aminés du polypeptide RA-1, déduite à partir de la séquence de l'ADNc, a été déterminée selon le cadre de lecture approprié au vecteur d'expression λ gt11. Un seul nucléotide diffère entre la séquence en COOH-terminal de l'ADNc de la calpastatine et la séquence de l'ADNc RA-1. Cette différence nucléotidique de G→A à la position 1937 entraîne une substitution d'un acide aminé de G→E à la position 592 (indiqué par un astérisque et des lettrages prononcés). Le début de la séquence peptidique de chaque domaine est indiqué par (I →). Les nucléotides et les résidus encadrés correspondent à la séquence consensus des domaines fonctionnels 3 et 4 (TIPPXYR) associés à l'activité inhibitrice de la calpastatine. Le codon de terminaison (TAA) est représenté au niveau peptidique par (---).

TTG AAG GGC ACA GTG CCA GAT GAT GCT GTA GAA GCC TTG GCT GAT AGC CTG GGG AAA AAG 1494
L K G T V P D D A V E A L A D S L G K K 444

■ → **domaine 3**

GAA GCA GAT CCA GAA GAT GGA AAA CCT GTG ATG GAT AAA GTC AAG GAG AAG GCC AAA GAA 1554
E A D P E D G K P V M D K V K E K A K E 464

GAA GAC CGT GAA AAG CTT GGT GAA AAA GAA GAA ACA ATT CCT CCT GAT TAT AGA TTA GAA 1614
E D R E K L G E K E E T I P P D Y R L E 484

GAG GTC AAG GAT AAA GAT GGA AAG CCA CTC CTG CCA AAA GAG TCT AAG GAA CAG CTT CCA 1674
E V K D K D G K P L L P K E S K E Q L P 504

CCC ATG AGT GAA GAC TTC CTT CTG GAT GCT TTG TCT GAG GAC TTC TCT GGT CCA CAA AAT 1734
P M S E D F L L D A L S E D F S G P Q N 524

GCT TCA TCT CTT AAA TTT GAA GAT GCT AAA CTT GCT GCT GCC ATC TCT GAA GTG GTT TCC 1794
A S S L K F E D A K L A A A I S E V V S 544

CAA ACC CCA GCT TCA ACG ACC CAA GCT GGA GCC CCA CCC CGT GAT ACC TCG CAG AGT GAC 1854
Q T P A S T T Q A G A P P R D T S Q S D 564

■ →

AAA GAC CTC GAT GAT GCC TTG GAT AAA CTC TCT GAC AGT CTA GGA CAA AGG CAG CCT GAC 1914
K D L D D A L D K L S D S L G Q R Q P D 584

domaine 4

*

CCA GAT GAG AAC AAA CCA ATG GAA GAT AAA GTA AAG GAA AAA GCT AAA GCT GAA CAT AGA 1974
P D E N K P M E D K V K E K A K A E H R 604

GAC AAG CTT GGA GAA AGA GAT GAC ACT ATC CCA CCT GAA TAC AGA CAT CTC CTG GAT GAT 2034
D K L G E R D D T I P P E Y R H L L D D 624

AAT GGA CAG GAC AAA CCA GTG AAG CCA CCT ACA AAG AAA TCA GAG GAT TCA AAG AAA CCT 2094
N G Q D K P V K P P T K K S E D S K K P 644

GCA GAT GAC CAA GAC CCC ATT GAT GCT CTC TCA GGA GAT CTG GAC AGC TGT CCC TCC ACT 2154
A D D Q D P I D A L S G D L D S C P S T 664

ACA GAA ACC TCA CAG AAC ACA GCA AAG GAT AAG TGC AAG AAG GCT GCT TCC AGC TCC AAA 2214
T E T S Q N T A K D K C K K A A S S S K 684

GCA CCT AAG AAT GGA GGT AAA GCG AAG GAT TCA GCA AAG ACA ACA GAG GAA ACT TCC AAG 2274
A P K N G G K A K D S A K T T E E T S K 704

CCA AAA GAT GAC TAA agaatacaagttaaggatctggtatctgcatgtaaaatcttcagctggatggatgactttgaaga 2359
P K D D ---

acaaaaggctttggcaacagaaaac 2384

Figure 29: Représentation schématique de l'ADNc codant pour la calpastatine humaine et du fragment RA-1 homologue. La pleine longueur de l'ADNc de la calpastatine humaine code pour un polypeptide de 708 acides aminés correspondant aux domaines L, 1, 2, 3 et 4. Les domaines 1 à 4 d'environ 140 acides aminés chacun possèdent une séquence consensus (TIPPLYR) fonctionnelle associée à l'activité inhibitrice de la calpastatine. Le clone RA-1 de 950 pb isolé est entièrement homologue avec les domaines 3 et 4 de l'ADNc de la calpastatine humaine. Les positions 1435 à 2286 de l'ADNc RA-1 codent pour un polypeptide de 284 acides aminés, tandis que les positions 2287 à 2384 sont non codantes (codon stop aux positions 2287-2289).

RA-1 CODE POUR 2 DOMAINES INHIBITEURS DE LA CALPASTATINE

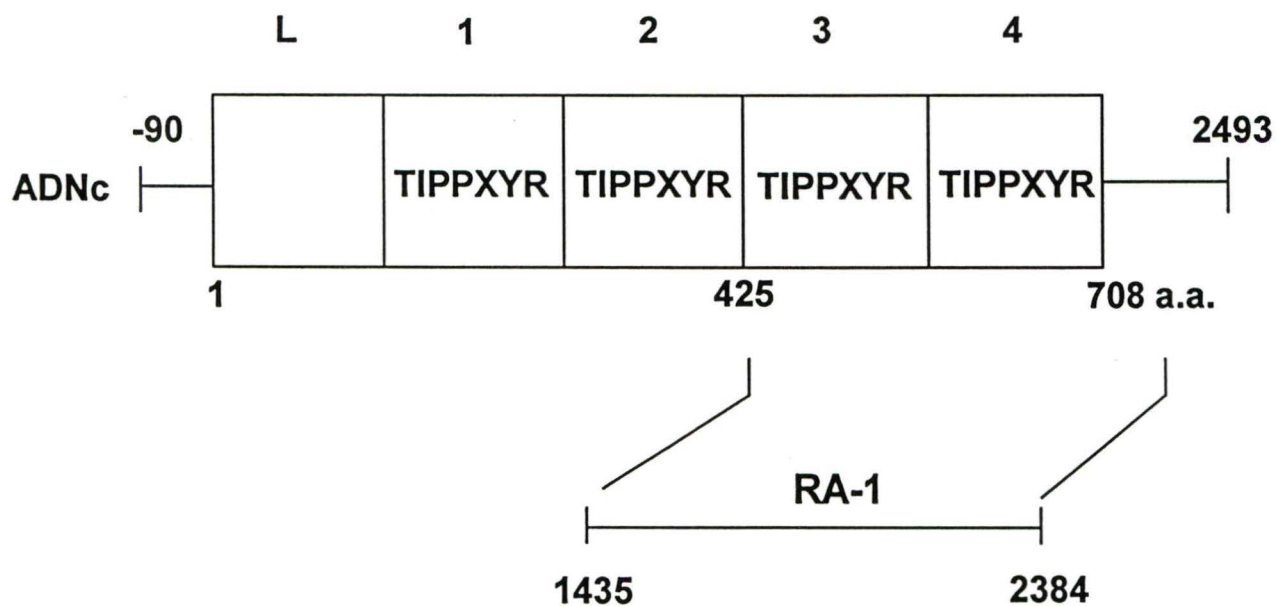
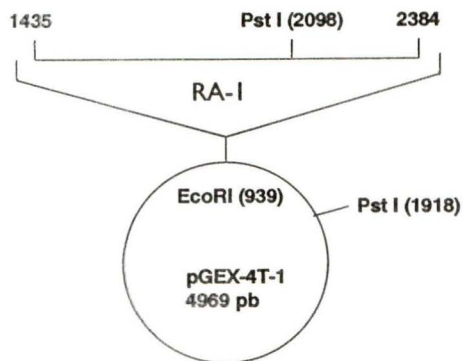


Figure 30: Sous-clonage du fragment RA-1 dans le vecteur d'expression pGEX-4T-1 et analyse sur gel d'agarose de l'orientation de l'insert par digestion avec Pst I. L'ADNc du clone RA-1 a été sous-cloné au site EcoR I du vecteur pGEX-4T-1 en respectant le cadre de lecture approprié avec λ gt11 (section A). La digestion du RA-1/pGEX-4T-1 par EcoR I donne deux fragments de 4969 et 950 pb correspondant au vecteur et à l'insert RA-1, respectivement (section B, ligne 1). L'orientation de l'insert a été confirmée par la digestion du plasmide avec Pst I résultant en deux fragments de 4584 et 1265 pb (section B, ligne 2). Ces fragments correspondent à ceux estimés à la section A. Le mélange des fragments de λ Hind III et de ϕ X174 Hae III a été utilisé comme marqueurs de poids moléculaires (section B, ligne M).

Ⓐ

Plasmide codant pour le clone RA-1



Orientation sens: 4584 et 1265
Orientation antisens: 4207 et 1642

Ⓑ

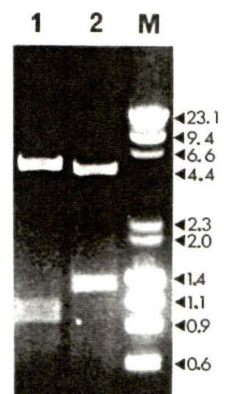


Figure 31: Analyse de la purification de la protéine recombinante exprimée dans pGEX-4T-1 par SDS-PAGE (section A) et par immunobuvardage (section B). La protéine recombinante a été induite à partir de bactéries *E. coli* PR745 *lon*- transformées avec le plasmide RA-1/pGEX-4T-1, purifiée sur colonne de Sépharose 4B et clivée par la thrombine tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les lysats bactériens ou les fractions purifiées de protéines ont été colorés au bleu de Coomassie (section A) ou transférés sur nitrocellulose et détectés en immunobuvardage avec le mélange de sérums rhumatoïdes dilué 1/100 (section B). Les échantillons protéiques séparés sont: le lysat de bactéries transformées avec RA-1/pGEX-4T-1 avant (ligne 1) et après (ligne 2) l'induction de la protéine de fusion GST-RA-1; le lysat de bactéries transformées avec le vecteur parental pGEX-4T-1 avant (ligne 3) et après (ligne 4) l'induction de la protéine porteuse GST seule; la GST-RA-1 (ligne 5) et la GST seule (ligne 6) purifiées sur colonne de Glutathione Sépharose 4B; la RA-1r obtenue à la suite du clivage par la thrombine de la GST-RA-1 liée à la colonne (ligne 7); et comme témoin, le clivage par la thrombine de la GST seule liée à la colonne (ligne 8).

Ⓐ



Ⓑ

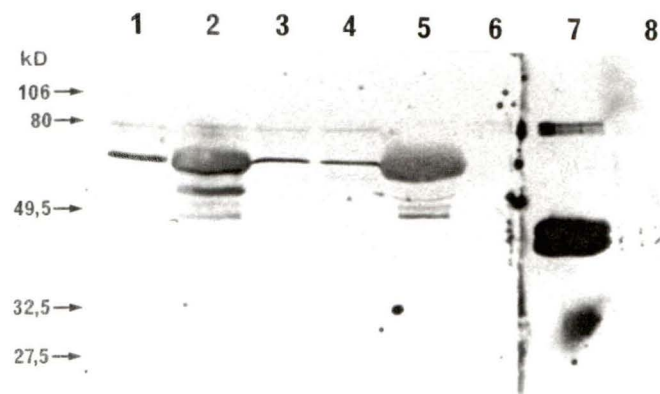
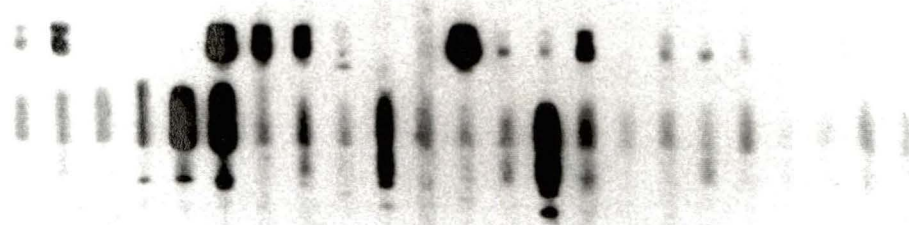


Figure 32: Immunobuvardage typique de la réactivité de sérums rhumatoïdes et de témoins contre les polypeptides GST-RA-1 (A) et RA-1r (B). Le polypeptide de fusion GST-RA-1 purifié par affinité et la RA-1r clivée par la thrombine ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec les sérums dilués 1/100 pour la GST-RA-1 ou 1/50 pour la RA-1r. Lignes 1-19: échantillons sériques provenant de 20 patients atteints de PR. Lignes 20-22: sérums de patients lupiques. Lignes 23-25: sérums d'individus normaux. Les sérums reconnaissant les deux bandes polypeptidiques supérieures de la GST-RA-1 (section A) ont été considérés positifs. La réactivité intense contre les bandes polypeptidiques sous la protéine de fusion représente des protéines contaminantes de *E. coli* reconnues par les anticorps naturels des sérums de patients. Dans le cas de la RA-1r (section B), la réactivité avec les deux bandes polypeptidiques supérieures a été considérée positive. L'ensemble des résultats obtenus tant avec la fusion qu'avec la recombinante était similaire. Les sérums incubés dans les lignes 1, 2, 6-9, 12, 14 et 15 sont fortement positifs, tandis que ceux des lignes 3, 4, 11 et 17-19 sont faiblement positifs. Des signaux inférieurs à ceux observés à la ligne 18, par exemple, ont été considérés négatifs.

Ⓐ

1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25



Ⓑ

1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25

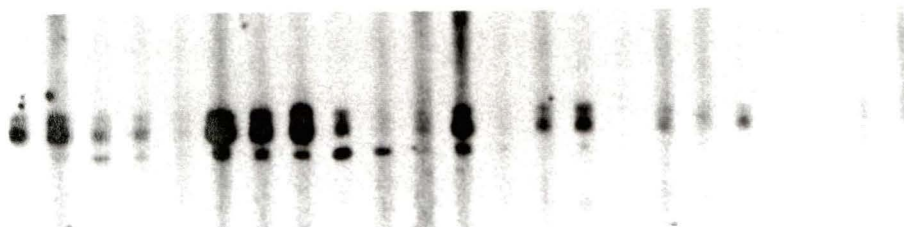


Figure 33: Analyse immunochimique de la réactivité croisée entre l'autoantigène Sa et le polypeptide RA-1r: expérience I. L'EPH séparé par SDS-PAGE et transféré sur nitrocellulose a été testé avec un sérum anti-Sa et anti-RA-1 positif dilué 1/200, absorbé ou non avec l'antigène Sa placentaire ou avec le polypeptide RA-1 (section A). L'intensité de la réactivité pour chacune des lignes a été quantifiée par analyse d'image (section B). Ligne 1: le sérum non absorbé. Lignes 2 et 3: le sérum absorbé avec 5 mg ou 10 mg d'EPH semi-purifié. Lignes 4 et 5: le sérum absorbé avec 100 ou 200 µg de RA-1r. Ligne 6: le sérum absorbé avec 1 mg de GST-RA-1 purifiée par affinité. Le sérum non absorbé représente 100% de la réactivité avec le triplet polypeptidique de l'antigène Sa placentaire (section B, ligne 1).

(A)

Sa

1 2 3 4 5 6

(B)

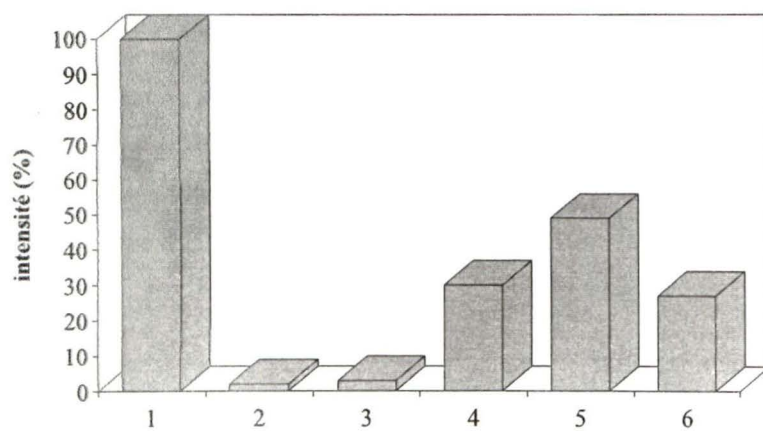
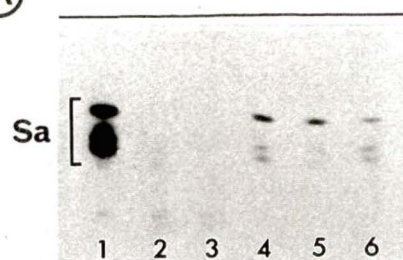
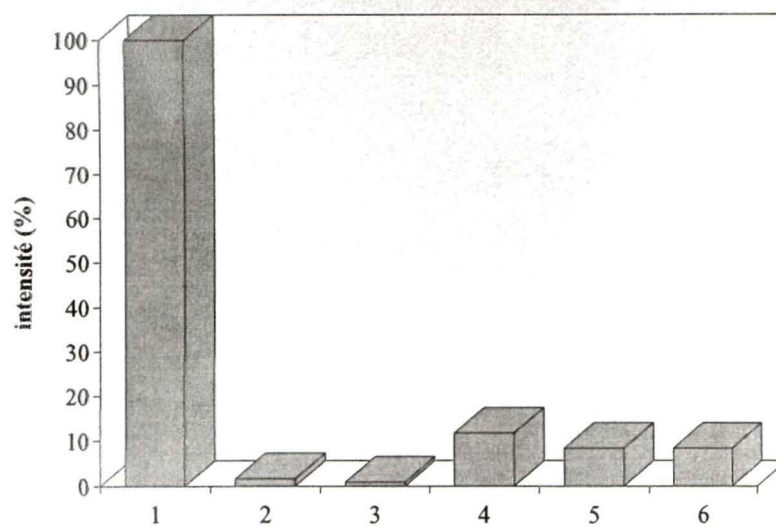


Figure 34: Analyse immunochimique de la réactivité croisée entre l'autoantigène Sa et le polypeptide RA-1r: expérience II. L'EPH a été traité comme pour la figure 33 et testé avec un autre sérum anti-Sa et anti-RA-1 positif dilué 1/200, absorbé ou non avec l'antigène Sa placentaire ou avec le polypeptide RA-1 (section A). L'intensité de la réactivité pour chacune des lignes a été quantifiée par analyse d'image (section B). Ligne 1: le sérum non absorbé. Lignes 2 et 3: le sérum absorbé avec 5 mg ou 10 mg d'EPH semi-purifié. Lignes 4 et 5: le sérum absorbé avec 100 ou 200 µg de RA-1r. Ligne 6: le sérum absorbé avec 1 mg de GST-RA-1 purifiée par affinité. Le sérum non absorbé représente 100% de la réactivité avec le triplet polypeptidique de l'antigène Sa placentaire (section B, ligne 1).

Ⓐ



Ⓑ



TABLEAUX

Tableau 1: Analyse comparative de l'autoantigène Sa avec les HSP en immunobuvardage en utilisant différentes sources d'anticorps et d'antigènes.

Anticorps	HSP 60 kD recombinante humaine	<i>Mycobacterium</i> <i>bovis</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i>	HSP induites dans les cellules HeLa	ERH (antigène Sa)
mAb anti-HSP 65 kD (7)	négatif	positif (60 kD)	positif (70 kD)	positif (60 kD)	positif (65 kD) ^b
mAb anti-HSP 70 kD	négatif	positif (70 kD)	positif (70 kD)	négatif	positif (70 kD)
mAb anti-HSP 71 kD	n/d ^a	n/d	n/d	n/d	positif (70 kD)
mAb anti-HSP 16–18 kD	n/d	n/d	n/d	n/d	négatif
Lapin anti-HSP 60 kD humaine	positif (60 kD)	n/d	positif (65 kD)	positif (60 kD)	négatif
Anticorps anti-Sa purifiés	négatif	négatif	négatif	négatif	positif (50 kD)

a: non effectué

b: Un seul des 7 anticorps monoclonaux anti-HSP 65 kD s'est révélé positif sur l'ERH.

Tableau 2: Homologies de séquences peptidiques de l'autoantigène Sa

Polypeptide	Séquence N-terminale (1-20 a.a.)
Bande 1 du Sa humain	(DA) P E E E D (H) V L V L (R) K S N F A E A
PDI 60 kD humaine <u>ou</u> TBG 57 kD humaine	D A P E E E D H V L V L R K S N F A E A
Bande 2 du Sa humain	(S S) V P G V X L L Q X X (E A) F
Bande 3 du Sa humain	(S S) V P G V V L L Q D S V D F
Vimentine humaine	S S V P G V R L L Q D S V D F

Tableau 3: Détection des anticorps anti-Sa dans les sérums de 482 patients atteints de maladies rhumatismales et de témoins.

GROUPE DIAGNOSTIQUE*	N	POSITIFS	%
Polyarthrite rhumatoïde	206	88	42.7
Collagénoses	165	2	1.2
Polyarthrites réactives/séronégatives	24	1	3.8
Arthrose	41	0	0
Normaux	36	0	0
Mononucléose infectieuse	10	0	0

* Se référer à la section matériel et méthodes pour le regroupement des patients et à la section résultats pour la description des patients non rhumatoïdes anti-Sa positifs.

Tableau 4: Anticorps anti-Sa dans des sous-groupes de polyarthrite rhumatoïde.

		Anti-Sa+	
	N	N	%
Total des P.R.	206	88	43
P.R., FR positif	143	71	50
P.R., FR négatif	63	17	27
P.R. débutante	31	9	29

Tableau 5: Analyse comparative des anticorps anti-Sa et du facteur rhumatoïde pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.

	ANTI-Sa	FR
Sensibilité	42,7%	69,4%
Spécificité	98,9%	76,9%
Valeur prédictive positive	96,7%	78,6%
Valeur prédictive négative	69,8%	67,4%

Tableau 6: Anticorps anti-RA-1 dans les sérums de 97 patients atteints de maladies rhumatismales et de témoins.

GROUPE DIAGNOSTIQUE*	N	POSITIFS	%
Polyarthrite rhumatoïde	44	21	45.5
Lupus érythémateux disséminé	11	0	0
Arthrose	27	2	7.4
Autres	5	0	0
Normaux	10	0	0

* Se référer à la section matériel et méthodes pour le regroupement des patients et à la section résultats pour la description des patients anti-RA-1 positifs.

Tableau 7: Corrélation entre les anticorps anti-Sa et les anticorps anti-calpastatine en utilisant 97 sérums de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et de témoins.

	Anti-calpastatine +	Anti-calpastatine -
Anti-Sa +	18	10
Anti-Sa -	5	64

PUBLICATIONS ET RÉSUMÉS

PUBLICATIONS

1. **MÉNARD, H.A., DESPRÉS, N., BOIRE, G.**
Autoantibody Markers in Rheumatoid Arthritis.
Proceedings of the First Canadian Rheumatologists Workshop.
Kush medical communications, 1993 ; p. 18–30.
2. **DESPRÉS, N., BOIRE, G., LOPEZ–LONGO, F.–J., MÉNARD, H.–A.**
The Sa System : A Novel Antigen–Antibody System Specific for
Rheumatoid Arthritis. (A clinical trial of 482 subjects).
Journal of Rheumatology 1994 ; 21 (6) : 1027–1033.
3. **BOIRE, G., DESPRÉS, N., MÉNARD, H.A.**
The Sa System: A Novel Antigen–Antibody System Specific for
Rheumatoid Arthritis.
Invited Response to the Editor.
Journal of Rheumatology, 1995 ; 22 (4) :789.
4. **DESPRÉS, N., TALBOT, G., BOIRE, G., MÉNARD, H.A.**
Detection and Expression of a cDNA Clone that Encodes a Polypeptide
Containing Two Inhibitory Domains of Human Calpastatin and Its
Recognition by Rheumatoid Arthritis Sera.
Journal of Clinical Investigation 1995 ; 95 :1891–1896.
5. **DESPRÉS, N., BOIRE, G., MÉNARD, H.A.**
Biochemical and Immunological Characterization of the Rheumatoid
Arthritis Sa Autoantigen : Presence of Sa in the rheumatoid synovium.
En préparation.

RÉSUMÉS

1. **DESPRÉS N, MÉNARD HA ET BOIRE G.**
Sa/anti-Sa et Ta/anti-Ta: Deux nouveaux systèmes autoimmuns spécifiques à l'arthrite rhumatoïde.
Journées scientifiques de la Faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke, les 29–30 mai 1990.
2. **DESPRÉS N, MÉNARD HA ET BOIRE G.**
Deux marqueurs autoimmuns spécifiquement liés à l'arthrite rhumatoïde (AR).
XX^e Conférence laurentienne de rhumatologie, Val-David, Québec, 7 et 8 juin 1990.
3. **DESPRÉS N, MÉNARD HA ET BOIRE G.**
Deux marqueurs autoimmuns spécifiquement liés à l'arthrite rhumatoïde (AR).
Club de recherches cliniques du Québec, Pointe-au-Pic, 27–29 septembre 1990.
Médecine Sciences (suppl.) 2 : 97, 1990.
4. **DESPRÉS N, MÉNARD HA AND BOIRE G.**
Characterization of Two New Antigen–Antibody Systems (Sa/Ta) in Patients with Rheumatoid Arthritis.
54th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, October 27–November 1, 1990–Seattle, Washington.
Arthritis and Rheumatism 33(suppl. 9):B147:S96, 1990.
5. **DESPRÉS N, BOIRE G, MÉNARD HA.**
Sa, Ta and RA33 are Unrelated Autoantigens Specific for Rheumatoid Arthritis.
55th Annual Scientific Meeting, American College of Rheumatology, November 17–21, 1991–Boston.
Arthritis and Rheumatism 34 (suppl. 9):C13:S135, 1991.
6. **DESPRÉS N, BOIRE G, MÉNARD HA.**
Sa/Ta and RA33 are Unrelated Autoimmune Systems of Rheumatoid Arthritis.
Dunlop International Symposium on Rheumatoid Arthritis, 23–25 mai 1991, Montréal, Québec.
Journal of Rheumatology, 19 (suppl. 32) : 39, 1992.

7. **DESPRÉS N, BOIRE G, MÉNARD HA.**
 Rheumatoid Arthritis Specific Sa Autoantigen: Absence of Immunological Cross-Reactivity with Human and Mycobacterial Heat Shock Proteins.
 Northeast Regional Meeting of the American College of Rheumatology, Toronto, June 4–7 1992.
Arthritis and Rheumatism, 35(suppl. 9);A23:S72, 1992.

8. **DESPRÉS N, BOIRE G, MÉNARD HA.**
 Caractérisation immunochimique de l'autoantigène Sa, reconnu spécifiquement par les séra de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.
 Journée scientifique de la Faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke, le 20 mai 1992.

9. **DESPRÉS N, BOIRE G, MÉNARD HA.**
 Caractérisation immunologique et immunochimique de l'autoantigène Sa, reconnu spécifiquement par les séra de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.
 XXIII^e Conférence laurentienne de rhumatologie, Val-David, Québec, 5 et 6 juin 1992.

10. **MÉNARD HA, DESPRÉS N.**
 Immunochemical Characterization and Identification of the Sa Protein : A Rheumatoid Arthritis Specific Autoantigen.
 International Symposium on Ribonucleoproteins and other Autoantigens. August 20–22, 1992–Vienna, Austria.

11. **DESPRÉS N, BOIRE G, MÉNARD HA, POOLE AR, ADAMS M, AND LAZURE C.**
 The Rheumatoid Arthritis Specific Sa Autoantigen is Present in High Concentration in the Target Tissue.
 56th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. Atlanta, Georgia, Octobre 11–15, 1992.
Arthritis and Rheumatism 35(suppl.9);A-24:S72, 1992.

12. **DESPRÉS, N., BOIRE, G., LOPEZ-LONGO, F.J., MÉNARD, H.-A.**
 An Autoimmune System Specific for Rheumatoid Arthritis : The Sa System.
 30 juin au 3 juillet 1993, Schloss Elmau, Germany.
Molecular and Cell Biology of Autoantibodies and Autoimmunity, 1993, p. 30.

13. **DESPRÉS, N., BOIRE, G., LOPEZ-LONGO, F.-J., MÉNARD, H.-A.**
 An Autoimmune System Specific for Rheumatoid Arthritis: The Sa System.
 Réunion annuelle du Collège royal des médecins et chirurgiens du Canada, Vancouver, B.C., 9-13 septembre 1993.
Clinical and Investigative Medicine, 16 (4) : 826, 1993.

14. **DESPRÉS, N., BOIRE, G., LOPEZ-LONGO, F.-J., MÉNARD, H.-A.**
 An Autoimmune System Specific for Rheumatoid Arthritis : The Sa System.
 5th Annual Scientific Meeting, 7-11 November 1993, San Antonio, Texas.
Arthritis and Rheumatism 36(suppl.9); A-158:S124, 1993.

15. **DESPRÉS, N., TALBOT, G., PLOUFFE, B., BOIRE, G., MÉNARD, H.A.**
 Clonage d'un cDNA humain codant pour la calpastatine et reconnaissance de la protéine de fusion exprimée par les sérums de patients rhumatoïdes.
 23^e édition de la journée scientifique, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, 11 mai 1994.

16. **DESPRÉS, N., TALBOT, G., PLOUFFE, B., BOIRE, G., MÉNARD, H.A.**
 Identification and Expression of a cDNA clone that Encode Human Calpastatin and Recognition by sera of patients with Rheumatoid Arthritis.
 American College of Rheumatology, 58th Annual Scientific Meeting, October 23-27, 1994-Minneapolis, Minnesota.
Arthritis and Rheumatism 37 (suppl. 9);764:S287, 1994.

17. **LANIEL, M.-A., DESPRÉS, N., MÉNARD, H.-A., ET BOIRE, G.**
 Caractérisation de nouveaux autoantigènes dans la polyarthrite rhumatoïde.
 24^e édition de la journée scientifique, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, 10 mai 1995.

18. **EL-AMINE, M., TALBOT, G., DESPRÉS, N., BOIRE, G., ASSELIN, C., MÉNARD, H.-A.**
 Isolement par une méthode non-radioactive de l'ADNc de la calpastatine, un autoantigène associé à la polyarthrite rhumatoïde.
 24^e édition de la journée scientifique, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, 10 mai 1995.

19. **DESPRÉS, N., TALBOT, G., PLOUFFE, B., BOIRE, G., MÉNARD, H.A.**
Detection and expression of a cDNA clone that encodes a polypeptide containing two inhibitory domains of human calpastatin and its recognition by rheumatoid arthritis sera.
26^e conférence laurentienne de rhumatologie, Val David, 9–10 juin 1995.
20. **LANIEL, M.-A., DESPRÉS, N., MÉNARD, H.-A., ET BOIRE, G.**
Caractérisation de nouveaux autoantigènes dans la polyarthrite rhumatoïde.
37^e réunion annuelle, club de recherche cliniques du Québec, Bromont, 28–30 septembre 1995.
21. **EL-AMINE, M., TALBOT, G., DESPRÉS, N., BOIRE, G., ASSELIN, C., MÉNARD, H.-A.**
Isolement par une méthode non-radioactive de l'ADNc de la calpastatine, un autoantigène associé à la polyarthrite rhumatoïde.
37^e réunion annuelle, club de recherche cliniques du Québec, Bromont, 28–30 septembre 1995.
22. **DESPRÉS, N., TALBOT, G., EL-AMINE, M., BOIRE, G., MÉNARD, H.-A.**
Sa and calpastatin: Two autoantigen highly specific for rheumatoid arthritis.
International Congress on Rheumatoid Arthritis, Bari – Italy, September 28–30, 1995.
23. **EL-AMINE, M., TALBOT, G., DESPRÉS, N., BOIRE, G., ASSELIN, C., MÉNARD, H.-A.**
Differential expression of two calpastatin mRNAs with different 3'UTRs, and recognition of recombinant proteins by sera of patients with rheumatoid arthritis.
American College of Rheumatology, 59th Annual Scientific Meeting, October 22–26, 1995, San Francisco – California.
Arthritis and Rheumatism **38 (suppl. 9): soumis.**

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord témoigner ma grande reconnaissance et mes sincères remerciements aux Docteurs Henri A. Ménard et Mario S. Nemirovsky, d'une part pour leurs conseils judicieux, leur disponibilité et leur amitié, et d'autre part pour les réalisations scientifiques qu'ils m'ont permis de faire sous leur direction. Je tiens aussi à leur manifester toute mon appréciation pour le support et la latitude qu'ils m'ont donnés dans la conduite de mes travaux de doctorat. J'aimerais également remercier sincèrement le Docteur Gilles Boire pour son support, sa disponibilité et sa grande collaboration tout au long de la réalisation de mes travaux.

À mes collègues et ami(e)s de laboratoire du service de rhumatologie de même qu'aux stagiaires d'été, particulièrement à Bertrand Plouffe, qui m'ont aidé de près ou de loin dans ma formation, avec qui j'ai eu un grand plaisir d'échanger et de collaborer au cours de ces années. Mes sincères remerciements à Marthe Bégin et Alice Chapdelaine pour leur support sécrétarial. Une attention particulière à Marc-André Laniel pour avoir porté un jugement critique sur la rédaction de cette thèse.

Aux professeurs du service de rhumatologie et du Département de biologie cellulaire avec qui les conseils, les échanges et le support constant ont agrémenté toutes ces années.

Au Docteur Claude Lazure de l'Institut de recherche clinique de Montréal, d'une part pour avoir réalisé le microséquençage peptidique, et d'autre part pour ses conseils indispensables.

Aux Docteurs Stephen M. Krane et Donald B. Bloch du *Massachusetts General Hospital* de l'Université Harvard à Boston pour m'avoir accueilli et fait vivre un séjour inoubliable à l'intérieur de leur groupe de recherche. Ce séjour a été pour moi une grande source de motivation dans la réussite de ma recherche.

À l'ensemble des collaborateurs à l'échelle nationale et internationale qui ont contribué de près ou de loin au développement et à l'avancement de ces travaux.

A tous mes ami(e)s, particulièrement à Youssef Sabeh, mes plus sincères remerciements pour leur amitié, leur appui constant et leur encouragement tout au long de ma formation de chercheur.

À mon épouse Nathalie, à mes parents, à mes frères et leur famille ainsi qu'à mes beaux parents, une profonde reconnaissance pour leur support moral constant tout au long de ces études.

Aux membres du jury, Dr Marianna Newkirk, Dr Brian Talbot et Dr Claude Asselin
mes remerciements pour avoir cordialement accepté de participer à la correction de
cette thèse.

Finalement, je remercie la Société d'Arthrite du Canada qui m'a octroyé une bourse
d'étude doctorale (3^{ième} cycle) pour une période de quatre années consécutives.

RÉFÉRENCES

.

.

- Abath FG, and Simpson AJG. A simple method for the recovery of purified recombinant peptides cleaved from glutathione S-transferase fusion proteins. *Biotechniques* **10**:178, 1991.
- Abbott SE, Kaul A, Stevens CR, and Blake DR. Isolation and culture of synovial microvascular endothelial cells. Characterization and assessment of adhesion molecule expression. *Arthritis Rheum.* **35**:401–405, 1992.
- Abe Y, Inada S, and Torikai K. A new autoantibody in patients with rheumatoid arthritis: characterization of the anti-HaT-1 antibody system. *Arthritis Rheum.* **31**:135–139, 1988.
- Acha-Orbea H. Bacterial and viral superantigens: roles in autoimmunity? *Ann. Rheum. Dis.* **52**:S6–S16, 1993.
- Adams ME, McDevitt CA, Ho A, and Muir H. Isolation and characterization of high-buoyant-density proteoglycans from semilunar menisci. *J. Bone Joint Surg.* **68A**:55–64, 1986.
- Adelstein S, Pritchard-Briscoe H, Aderson TA, Crosbie J, Gammon G, Lablay RH, Basten A, and Goodnow CC. Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science* **251**:1223–1225, 1991.
- Aho K, and Kurki P. Seropositive versus seronegative rheumatoid arthritis – time for a new definition. *J. Rheumatol.* **21**:388–390, 1994.

- Aho K, von Essen R, Kurki P, Palosuo T, and Heliövaara M. Antikeratin antibody and antiperinuclear factor as markers for subclinical rheumatoid disease process. *J. Rheumatol.* **20**:1278–1281, 1993.
- Aitchison CT, Peebles C, Joslin F, and Tan EM. Characteristics of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **23**:528–538, 1980.
- Alcover A, Molano J, Renart J, Gil-Aguado A, Nieto A, and Avila J. Antibodies to vimentin intermediate filaments in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **27**:922–928, 1984.
- Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, and Albertini RJ. T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* **247**:718–721, 1990.
- Alpert SD, Koide J, Takada S, and Engleman EG. T cell regulatory disturbance in the rheumatic diseases. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **13**:431–445, 1987.
- Alspaugh MA, and Tan EM. Serum antibody in rheumatoid arthritis reactive with a cell-associated antigen: demonstration by precipitation and immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* **19**:711–719, 1975.
- Altmann DM, Sansom D, and Marsh SGE. What is the basis for HLA-DQ associations with autoimmune disease ? *Immunol. Today* **12**:267–270, 1991.
- Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, and Firestein GS. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. IV. Granulocyte/macrophage colony-stimulating

factor-mediated induction of class II MHC antigen on human monocytes: a possible role in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **170**:865–875, 1989.

Amento EP. Is rheumatoid arthritis driven by oligoclonal T cells? *Clin. Exp. Rheumatol.* **11**(Suppl.8):S15, 1993.

Arend WP, and Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **33**:305–315, 1990.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger Jr. TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, and Hunder GG. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31**:315–324, 1988.

Arnold B, Schönrich G, and Hämmerling GJ. Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol. Today* **14**:12–14, 1993.

Asada K, Ishino Y, Shimada M, Shimojo T, Endo M, Kimizuka F, Kato I, Maki M, Hatanaka M, and Murachi T. cDNA cloning of human calpastatin: sequence homology among human, pig, and rabbit calpastatin. *J. Enzyme Inhibition* **3**:49–56, 1989.

Asherson RAM and Cervera R. The antiphospholipid syndrome: a syndrome in evolution. *Ann. Rheum. Dis.* **51**:147–150, 1992.

Atkinson MA, Maclaren NK, Scharp DW, Lacy PE, and Riley WJ. 64000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet* **335**:1357–1360, 1990.

Austin AK, Hobbs RN, Anderson JC, Butler RC, and Ashton BA. Humoral immunity to link protein in patients with inflammatory joint disease, osteoarthritis, and in non-arthritic controls. *Ann. Rheum. Dis.* **47**:886–892, 1988.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K. *Short Protocols In Molecular Biology*. Harvard Medical School. Second Edition. John Wiley & Sons, 1992.

Avrameas S. Natural autoantibodies: from "horror autotoxicus" to "gnostic seauton". *Immunol. Today* **12**:154–159, 1991.

Baekkeskov S, Aanstoot HK, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, and DeCamilli P. Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* **347**:151–156, 1990.

Baekkeskov S, Landin M, Kristensen JK, Sridanta S, Bruining GJ, Mandrup-Poulsen T, de Beaufort C, Soeldner JS, Eisenbarth G, Lundgren F, Sundquist G, and Lernmark A. Antibodies to a Mr-64000 islet cell protein precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **79**:926–934, 1988.

Basten A, Brink R, Peake P, Adams E, Crosbie J, Hartley SB and Goodnow CC. Self tolerance in the B-cell repertoire. *Immunol. Rev.* **122**:5–19, 1991.

Baum J, Zwillich SH, and Ziff M. Laboratory findings in rheumatoid arthritis, *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. 12th Edition. Edited by DJ. McCarty, WJ. Koopman. Lea & Febiger, Philadelphia, London. 841–860, 1993.

Ben-Chetrit E, Chan EK, Sullivan KF, and Tan EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.* **167**:1560–1571, 1988.

Ben-Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, and Sullivan KF. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J. Clin. Invest.* **83**:1284–1292, 1989.

Ben-Chetrit E. The molecular basis of the SSA/Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies. *Brit. J. Rheumatol.* **32**:396–402, 1993.

Bhardwaj N, Hodssev AS, Nisanian A, Kabak S, Friedman SM, Cole BC, and Posnett DN. Human T-cell responses to *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen. *Infect. Immun.* **62**:135–144, 1994.

Billings PB, Hoch SO, White PJ, Carson DA, and Vaughan JH. Antibodies to the Epstein-Barr virus nuclear and to rheumatoid arthritis nuclear antigen identify the same polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:7104–7108, 1983.

- Bini P, Chu JL, Okolo C, and Elkon K. Analysis of autoantibodies to recombinant La(SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* **85**:325–333, 1990.
- Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* **100**:243–255, 1983.
- Blackman M, Kappler J, and Marrack P. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* **248**:1335–1341, 1990.
- Bloom H, Beier H, and Gross HS. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**:93–99, 1987.
- Blüthner M, and Bautz FA. Cloning and characterization of the cDNA coding for a polymyositis-scleroderma overlap syndrome-related nucleolar 100-kD protein. *J. Exp. Med.* **176**:973–980, 1992.
- Boehm J, Orth T, Van Nguyen P, and Soling HD. Systemic lupus erythematosus is associated with increased auto-antibody titers against calreticulin and grp94, but calreticulin is not the Ro/SS-A antigen. *Eur. J. Clin. Invest.* **24**:248–257, 1994.
- Boire G, and Craft J. Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles: analysis with sera specific for the Ro^{hys} particle. *J. Clin. Invest.* **84**:270–279, 1989.

- Boire G, and Ménard HA. Clinical significance of anti-Ro(SSA) antibody in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **15**:391–394, 1988.
- Boire G, Lopez-Longo FJ, Lapointe S, and Ménard HA. Sera from patients with autoimmune diseases recognized conformational determinants on the 60 kD Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum.* **34**:722–730, 1991.
- Boire G, Ménard HA, Gendron M, Lussier A, and Myhal D. Rheumatoid arthritis: anti-Ro antibodies define a non-HLA-DR4 associated clinicoserological cluster. *J. Rheumatol.* **20**:1654–1660, 1993.
- Boog CJ, De Graeff-Meeder ER, Lucassen MA, Van der Zee R, Voorhorst-Ogink MM, van Kooten PJ, Geuze HJ, and van Eden W. Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J. Exp. Med.* **175**:1805–1810, 1992.
- Bottazzo GF, Pujol-Borell R, Hanafusa T, Feldman M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* **2**:1115–1119, 1983.
- Bottazzo GF, Todd I, Mirakian R, Belfiore A, and Pujol-Borrell R. Organ-specific autoimmunity: a 1986 overview. *Immunol. Rev.* **94**:135–169, 1986.
- Bradd SJ, and Dunn MJ. Analysis of membrane proteins by western blotting and enhanced chemiluminescence. *Meth. Mol. Biol.* **19**:211–218, 1993.

Brakas S, Gabriel JM, Mauron A, Hughes J, Roth B, Alliod C, Tzartos S, and Ballivet M. Monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the nicotinic acetylcholine receptor bind to residues 61–76 of the α subunit. *J. Biol. Chem.* **263**:5916–5920, 1988.

Breedveld FC, and Trentham DE. Progress in the understanding of inducible models of chronic arthritis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **13**:531–544, 1987.

Brennan FM, Gibbons DL, Mitchell T, Cope AP, Maini RN, and Feldmann M. Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints. *Eur. J. Immunol.* **22**:1907–1912, 1992.

Brocke S, Gaur A, Piercy C, Gautam A, Gijbels K, Fathman CG, and Steinman L. Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* **365**:642–644, 1993.

Brousset P, Caulier M, Cantagrel A, Dromer C, Mazieres B, and Delsol G. Absence of Epstein–Barr virus carrying cells in synovial membranes and subcutaneous nodules of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **52**:608–609, 1993.

Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, and Rubin RL. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **94**:184–192, 1994.

Burman KD, and Baker JR Jr. Immune mechanisms in Graves' disease. *Endocrinol. Rev.* **6**:183–232, 1985.

Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *The Australian Journal of Science* **20**:67–69, 1957.

Buttle DJ. Lysosomal cysteine endopeptidases in the degradation of cartilage and bone, *Textbook of Immunopharmacology: Immunopharmacology of Joints and Connective Tissue*. Edited by Davies ME, and Dingle JT. London Academic Press. pp. 225–243, 1993.

Buyon JP, Slade SG, Reveille JD, Hamel JC, and Chan EK. Autoantibody responses to the "native" 52-kDa SS-A/Ro protein in neonatal lupus syndrome, systemic lupus erythematosus, and Sjogren's syndrome. *J. Immunol.* **152**:3675–3684, 1994.

Cambridge G, Wallace H, Bernstein RM, and Leaker B. Autoantibodies to myeloperoxidase in idiopathic and drug-induced systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Br. J. Rheumatol.* **33**:109–114, 1994.

Campanelli D, Melchior M, Fu Y, Nakata M, Shuman H, Nathan C, and Gabay J. Cloning of cDNA for proteinase 3; a serin protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J. Exp. Med.* **172**:1709–1715, 1990.

Campion GV. The prospect for cytokine based therapeutic strategies in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **53**:485–487, 1994.

- Casciola-Rosen LA, Anhalt G, and Rosen A. Autoantigens targetted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* **179**:1317–1330, 1994.
- Case JP, Lafyatis R, Remmers EF, Kumkumian GK, and Wilder RL. Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium: a transformation-associated metalloproteinase secreted by phenotypically invasive synoviocytes. *Am. J. Pathol.* **135**:1055–1064, 1989.
- Catalano MA, Carson DA, Slovin SF, Richman DD, and Vaughan JH. Antibodies to Epstein-Barr virus-determined antigens in normal subjects and in patients with seropositive rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5825–5828, 1979.
- Cavallo MG, Pozzilli P, and Thorpe R. Cytokines and autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* **96**:1–7, 1994.
- Cha S, Leung PSC, Gershwin ME, Fletcher MP, Ansari AA, and Coppel RL. Combinatorial autoantibodies to dihydrolipoamide acetyltransferase, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2527–2531, 1993.
- Chambers JC, and Keene JD. Isolation and analysis of cDNA clones expressing human lupus La antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:2115–2119, 1985.

- Chapdelaine P, Lazure C, Deperthes D, Tremblay RR, and Dubé JY. The major dog pancreas protein recognized by an antiserum to dog prostate kallikrein is the anionic trypsin. *Int. J. Biochem.* **25**:1743–1747, 1993.
- Chazenbalk GD, Portolano S, Russo D, Hutchison JS, Rapoport B, and McLachlan S. Human organ-specific autoimmune disease. Molecular cloning and expression of an autoantibody gene repertoire for a major autoantigen reveals an antigenic immunodominant region and restricted immunoglobulin gene usage in the target organ. *J. Clin. Invest.* **92**:62–74, 1993.
- Chen C, Radic MZ, Erikson J, Camper SA, Litwin S, Hardy RR, and Weigert M. Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. *J. Immunol.* **152**:1970–1982, 1994.
- Choi EKK, Gatenby PA, Dateman JF, and Cole WG. Antibodies to type II collagen in SLE: a role in the pathogenesis of deforming arthritis. *Immunol. Cell. Biol.* **68**:27–31, 1990.
- Christgau S, Schierbeck H, Aanstoot HK, Aagaard L, Begley K, Kovod H, Hehnaes K, and Baekkeskov S. Pancreatic β cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-kDa hydrophilic form and a 64-kDa amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. *J. Biol. Chem.* **266**:21257–21264, 1991.
- Christie MR, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, and Delovitch TL. Detection of pancreatic islet 64,000 M_r autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. *J. Clin. Invest.* **92**:240–248, 1993.

- Chu CQ, Field M, Feldmann M, and Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage–pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **34**:1125–1132, 1991.
- Ciccone E, Pende D, Vitale M, Nanni L, Di Donato C, Bottino C, Morelli L, Viale O, Amoroso A, Moretta A, and Moretta L. Self class I molecules protect normal cells from lysis mediated by autologous natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* **24**:1003–1006, 1994.
- Clark G, Reichlin M, and Tomasi Jr. TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **102**:117–122, 1969.
- Cohen IR, and Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today* **12**:105–110, 1991.
- Cook AD, Rowley MJ, Stockman A, Muirden KD, and Mackay IR. Specificity of antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **21**:1186–1191, 1994.
- Cooke MP, Heath AW, Shokat KM, Zeng Y, Finkelman FD, Linsley PS, Howard M, and Gooknow CC. Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell–T cell interactions and is blocked in tolerant self–reactive B cells. *J. Exp. Med.* **179**:425–438, 1994.
- Cope AP, Londei M, Chu NR, Cohen SB, Elliott MJ, Brennan FM, Maini RN, and Feldmann M. Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro

impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex;
reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis.
J. Clin. Invest. **94**:749–760, 1994.

Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, and Mosedale B. Immunization
against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. Nature
283:666–668, 1980.

Coutinho A. Beyond clonal selection and network. Immunol. Rev. **110**:63–87.

Craft J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythematosus. Rheum. Dis. Clin.
N. Am. **18**:311–335, 1992.

Croall DE, and Demartino GN. Calcium-activated neutral protease (calpain)
system: structure, fonction, and regulation. Physiol. Rev. **71**:813–847, 1991.

Cush J, and Lipsky PE. Cellular basis for rheumatoid arthritis. Clin. Orthopaedics
Rel. Res. **265**:9–12, 1991.

Dallman MJ, Wood KJ, Hamano K, Bushell AR, Morris PJ, Wood MJA, and
Charlton HM. Cytokines and peripheral tolerance to alloantigen. Immunol.
Rev. **133**:5–18, 1993.

Dalpé G, Béliveau A, and Ménard HA. Cross-reactivity of anti anti-proteinase 3
antibody to elastase. Autoimmunity **16**:311–313, 1993a.

Dalpé G, Boire G, and Ménard HA. The conformational determinants recognized by Wegner's C-ANCAs are situated at or near the catalytic domain of myeloblastin. *Clin. Exp. Immunol.* **93**(suppl. 1):21, 1993b.

Daniel TO, Milfay DF, Escobedo J, and Williams LT. Biosynthetic and glycosylation studies of cell surface platelet-derived growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* **262**:9778–9784, 1987.

Danieli MG, Candela M, Ricciatti AM, Reginelli R, Danieli G, Cohen IR, and Gabrielli A. Antibodies to mycobacterial 65 kDa heat shock protein in systemic sclerosis (scleroderma). *J. Autoimmunity* **5**:443–452, 1992a.

Danieli MG, Markovits D, Gabrielli A, Corvetta A, Giorgi PL, Van der ZEE R, van Embden JD, Dianeli G, and Cohen IR. Juvenile rheumatoid arthritis patients manifest immune reactivity to the mycobacterial 65–kDa heat shock protein, to its 180–188 peptide, and to a partially homologous peptide of the proteoglycan link protein. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **64**:121–128, 1992b.

Dayer JM, Beutler B, and Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor (TNF) stimulates collagenase and PGE₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* **162**:2163–2168, 1985.

Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, and Dinarello CA. Human recombinant interleukin-1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells. *J. Clin. Invest.* **77**:645–648, 1986.

- De Benedetti A, and Baglioni C. Activation of hemin-regulated initiation factor-2 kinase in heat-shocked HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **261**:338–342, 1986.
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, and Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* **84**:678–685, 1989.
- Degre M, Mellbye OJ, and Clarke-Jenssen O. Immune interferon in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis and related disorders. *Ann. Rheum. Dis.* **42**:672–676, 1983.
- Després N, Boire G, Lopez-Longo FJ, and Ménard HA. The Sa system: A novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatology* **21**:1027–1033, 1994.
- Dong X, Hamilton KJ, Satoh M, Wang J, and Reeves WH. Initiation of autoimmunity to the p53 tumor suppressor protein by complexes of p53 and SV40 large T antigen. *J. Exp. Med.* **179**:1243–1252, 1994.
- Dong Xu W., Firestein GF, Taetle R, Kaushansky K, and Zvaifler NJ. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. II. GM-CSF in rheumatoid synovial effusions. *J. Clin. Invest.* **83**:876–882, 1989.
- Dorf ME, Kuchroo VK, and Collins M. Suppressor T cells: some answers but more questions. *Immunol. Today* **13**:241–243, 1992.

Doullay F, Ruf J, Codaccioni JL, and Carayon P. Prevalence of autoantibodies to thyroperoxidase in patients with various thyroid and autoimmune diseases. *Autoimmunity* **9**:237–244, 1991.

Duke O, Panayi GS, Janossy G, and Poulter LW. An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **49**:22–30, 1982.

Earnshaw WC, and Rothfield NF. Identification of a family of three related centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* **91**:313–321, 1985.

Earnshaw WC, Sullivan KF, Machlin PS, Kaiser DA, Pollard TD, Rothfield NF, and Cleveland DW. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J. Cell Biol.* **104**:817–829, 1987.

Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinto FM, Di Giovine FS, and Duff GW. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2**:706–709, 1988.

Elliott JJ. The identity of the cells that positively select thymocytes. *Immunol. Rev.* **135**:215–226, 1993.

Elliott MJ, and Maini RN. New directions for biological therapy in rheumatoid arthritis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **104**:112–125, 1994.

Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedyeld FC, Macfarlane JD, Bijl H, and Woody JN. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**:1105–1110, 1994a.

Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Bijl H, and Woody JN. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**:1125–1127, 1994b.

Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghayeb J, and Woody JN. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* **36**:1681–1690, 1993.

Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Minami Y, and Suzuki K. All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**:2364–2370, 1988.

Esser RE, Angelo RA, Murphey MD, Watts LM, Thornburg LP, Palmer JT, Talhouk JW, and Smith RE. Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **37**:236–247, 1994.

- Evanson JM, Jeffrey JJ, and Krane SM. Human collagenase: identification and characterization of an enzyme from rheumatoid synovium in culture. *Science* **158**:499–502, 1967.
- Eynon EE, and Parker DC. Parameters of tolerance induction by antigen targeted to B lymphocytes. *J. Immunol.* **151**:2958–2964, 1993.
- Eynon EE, and Parker DC. Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J. Exp. Med.* **175**:131–138, 1992.
- Fabregas–Canales D, Meyer O, Haim T, and Kuntz D. Signification des anticorps anti-filaments intermédiaires au cours de la polyarthrite rhumatoïde, des rhumatismes inflammatoires chroniques et des connectivites. *Rev. Rhum.* **56**:45–50, 1989.
- Falk RJ, and Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* **318**:1651–1657, 1988.
- Fambrough DM, Drachman DB, and Satyamurti S. Neuromuscular junction in MG: decreased acetylcholine receptor. *Science* **182**:293–295, 1973.
- Ferrell PB, Aitcheson CT, and Pearson GR. Antibodies to Epstein–Barr virus related antigens in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **67**:681–687, 1981.

French-Constant C. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Lancet* **343**:271–275, 1994.

Firestein GS, Tsai V, and Zvaifler NJ. Cellular immunity in the joints of patients with rheumatoid arthritis and other forms of chronic synovitis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **13**:191–445, 1987.

Fong KY, Boey ML, Koh WH, and Feng PH. Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: correlation with bony erosions. *Clin. Exp. Rheumatol.* **12**:55–58, 1994.

Fox RI, Lotz M, Rhodes G, and Vaughan JH. Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheum. Dis.* **11**:665–688, 1985.

Frank MB, Itoh K, and McCubbin V. Epitope mapping of the 52-kD Ro/SSA autoantigen. *Clin. Exp. Immunol.* **95**:390–396, 1994.

Franke WW, Schmid E, Osborn M, and Weber K. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* **81**:570–580, 1979.

Friedman SM, Posnett DN, Tumang JR, Cole BC, and Crow MK. A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* **34**:468–480, 1991.

Frish SM, and Ruley HE. Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. Biol. Chem.* **262**:16300–16304, 1987.

Fritzler MJ, and Tan EM. Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **62**:560–567, 1978.

Fukui I, Tanaka K, and Murachi T. Extracellular appearance of calpain and calpastatin in the synovial fluid of the knee joint. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **162**:559–566, 1989.

Fuller GC. Perspective for the use of collagen synthesis inhibitors as antifibrotic agents. *J. Med. Chem.* **24**:651–658, 1981.

Gabrijelcic D, Annan-Prah A, Rodic B, Rozman B, Cotic V, and Turk V. Determination of cathepsins B and H in sera and synovial fluids of patients with different joint diseases. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **28**:149–153, 1990.

Gammon G, Sercarz EE, and Benichou G. The dominant self and the cryptic self: shaping the autoreactive T-cell repertoire. *Immunol. Today* **12**:193–195, 1991.

Gaston H. Synovial lymphocytes and the aetiology of synovitis. *Ann. Rheum. Dis.* **52**:S17–S21, 1993.

Gaur A, and Fathman CG. Immunotherapeutic strategies directed at the trimolecular complex. *Adv. Immunol.* **56**:219–265, 1994.

- Gautam A, Pearson C, Smilek D, Steinman L, and McDevitt HO. A polyalanine peptide containing only five native basic protein residues induces autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **176**:605–609, 1992.
- Gay D, Saunders T, Camper S, and Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* **177**:999–1008, 1993.
- Gershoni JM, and Palade GE. Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**:1–15, 1983.
- Glant TT, Fülöp C, Mikecz K, Buzás E, Molnár G, and Erhardt P. Proteoglycan-specific autoreactive antibodies and T-lymphocytes in experimental arthritis and human rheumatoid arthritis. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:796–799, 1990.
- Goding JW. Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modifications to the standard methods. *J. Immunol. Meth.* **13**:215–226, 1976.
- Gohill J, Cary PD, Couppez M, and Fritzler MJ. Antibodies from patients with drug-induced and idiopathic lupus erythematosus react with epitopes restricted to the amino and carboxyl termini of histone. *J. Immunol.* **135**:3116–3121, 1985.
- Goldschmeding R, van der Schoot CE, ten Bokkel Huinink D, Hack CE, and van den Ende ME. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84**:1577–1587, 1989.

Goldschmeding R, Cohen Tervaert JW, van der Schoot CE, van der Giessen M, von dem Borne AEG Kr., and Kallenberg CGM. Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes: a novel class of autoantibodies associated with vasculitis syndrome. *Kidney Int. (Abstr.)* **34**:558–559, 1988.

Goodacre JA, Brownlie CED, and Ross DA. Bacterial superantigens in autoimmune arthritis. *Brit. J. Rheum.* **33**:413–419, 1994.

Goodnow CC, Adelstein S, and Basten A. The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science* **248**:1373–1379, 1990.

Goodnow CC, Brink R, and Adams E. Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes. *Nature* **352**:532–536, 1991.

Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie TB, Smith-Gill SJ, Brink RA, Pritchard-Briscoe H, Wotherspoon JS, Loblay RH, Raphael K, Trent RJ, and Basten A. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**:676–682, 1988.

Goodnow CC. B-cell tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* **4**:703–710, 1992b.

Goodnow CC. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **10**:489–518, 1992a.

Green DR, and Webb DR. Saying the "S" word in public. *Immunol. Today* **14**:523–525, 1993.

Guyon T, Levasseur P, Truffault F, Cottin C, Gaud C, and Berrih-Aknin S. Regulation of acetylcholine receptor α subunit variants in human myasthenia gravis. *J. Clin. Invest.* **94**:16–24, 1994.

Habets WJ, Hoet MH, and van Venrooij WJ. Epitope patterns of anti-RNP antibodies in rheumatic diseases. Evidence for an antigen-driven autoimmune response. *Arthritis Rheum.* **33**:834–841, 1990.

Hämmerling G, Schönrich G, Ferber I, and Arnold B. Peripheral tolerance as a multi-step mechanism. *Immununol. Rev.* **133**:93–104, 1993.

Handwerger BS. T-cell and B-cell function in lupus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **3**:757–779, 1991.

Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, and Arnett FC. Anti-Ro (SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **29**:196–206, 1986.

Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N. Engl. J. Med.* **322**:1277–1289, 1990.

Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A, and Goodnow CC. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* **72**:325–335, 1993.

Hartley SB, Crosbie J, Brink R, Kantor AB, Basten A, and Goodnow CC. Elimination from peripheral lymphoid tissue of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* **353**:765–769, 1991.

Hartmuth K, and Barta A. In vitro processing of the human growth hormone primary transcript. *Nucl. Acids Res.* **15**:7005–7025, 1987.

Hartwig M. Control of clonal deletion in the thymus: Implications for tolerance induction. *Immunol. Cell Biol.* **71**:337–340, 1993.

Hasler F, Bluestein HG, Zvaifler NJ, and Epstein L. Analysis of the defects responsible for the impaired regulation of Epstein–Barr virus–induced B cell proliferation by rheumatoid arthritis lymphocytes: I. Diminished gamma interferon production in response to autologous stimulation. *J. Exp. Med.* **157**:173–188, 1983.

Hassfeld W; Steiner G, Graninger W, Witzmann G, Schweitzer H, and Smolen JS. Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis. *Brit. J. Rheumatol.* **32**:199–203, 1993.

Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, Kolarz G, Scherak O, Graninger W, Thumb N, and Smolen JS. Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **32**:1515 – 1520, 1989.

Haynes BF, Hale LP, Denning SM, Le PT, and Singer KH. The role of leukocyte adhesion molecule in cellular interaction: implications for the pathogenesis of inflammatory synovitis. *Springer Semin. Immunopathol.* **11**:163–185, 1989.

Hazelton RA, Sculley TB, and Pope JH. The prevalence of antibodies to an Epstein–Barr virus–induced polypeptide (EBNA-2) in the sera of rheumatoid arthritic families. *Brit. J. Rheumatol.* **26**:193–196, 1987.

He X, Goronzy JA, and Weyand C. Selective induction of rheumatoid factors by superantigens and human helper T cells. *J. Clin. Invest.* **89**:673–680, 1992.

Hexham M, Person MAA, Pegg C, Burton DR, Furmaniak J, and Rees Smith B. Cloning and expression of a human thyroglobulin autoantibody. *Autoimmunity* **11**:69–70, 1991.

Hietarinta M, Ilonen J, Lassila O, and Hietaharju A. Association of HLA antigens with anti–Scl-70–antibodies and clinical manifestations of systemic sclerosis (scleroderma). *Brit. J. Rheumatol.* **33**:323–326, 1994.

Hodgkin PD, Yamashita LC, Seymour B, Coffman RL, and Kehry MR. Membranes from both Th1 and Th2 T cell clones stimulate B cell proliferation and prepare B cells for lymphokine–induced differentiation to secrete Ig. *J. Immunol.* **147**:3696–3702, 1991.

Hoet RMA, Boerbooms AMTh, Arends M, Ruiter DJ, and van Venrooij WJ. Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis:

colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann. Rheum. Dis.* **50**:611–618, 1991.

Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Jansson L, and Mo JA. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol. Rev.* **118**:193–232, 1990.

Holmdahl R, Jansson L, Larsson E, Rubin K, and Klareskog L. Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* **29**:106–113, 1986.

Holoshitz J, Vila LM, Keroack BJ, McKinley DR, and Bayne NK. Dual recognition by cloned human $\gamma\delta$ T cells. *J. Clin. Invest.* **89**:308–314, 1992.

Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Trahl NI, Decker JL, and Notkins AL. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* **301**:5–8, 1979.

Howell MD, Diveley JP, Lundeen KA, Esty A, Winters ST, Carlo DJ, and Brostoff SW. Limited T-cell receptor β -chain heterogeneity among interleukin 2 receptor positive synovial T cells suggest a role for superantigens in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10921–10925, 1991.

Huet G, Flipo RM, Colin C, Janin A, Hemon B, Collyn-d'Hooghie, Lafyatis R, Duquesnoy B, and Degand P. Stimulation of the secretion of latent cyteine proteinase activity by tumor necrosis factor α and interleukin-1. *Arthritis Rheum.* **36**:772–780, 1993.

- Huet G, Flipo RM, Richet C, Thiebaut C, Demeyer D, Balduyck M, Duquesnoy B, and Degand P. Measurement of elastase and cysteine proteinases in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, sero-negative spondylarthropathies, and osteoarthritis. *Clin. Chem.* **38**:1694–1697, 1992.
- Inman RD. Infectious etiology of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **17**:859–870, 1991.
- Isenberg DA, Steiner G, and Smolen JS. Clinical utility and serological connections of anti-RA33 antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **21**:1260–1263, 1994.
- Jackson J. Autoantibody-facilitated proteolytic cleavage: a new pathogenic mechanism in autoimmunity. *Biochem. Soc. Trans.* **19**:176–180, 1991.
- Janis EM, Kaufmann SHE, Schwartz RH, and Pardoll DM. Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **244**:713–716, 1989.
- Jenkins MK. The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunol. Today* **13**:69–73, 1992.
- Jennette JC. Pathogenic potential of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Lab. Invest.* **70**:135–137, 1994.

Johnson GD, Carvalho A, Holborow EJ, Goddard DH, and Russel G. Antiperinuclear factor and keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheu. Dis.* **40**:263–266, 1981.

Karlsson-Parra A, Söderström K, Ferm M, Ivanyi J, Kiessling R, and Klareskog L. Presence of human 65 kD heat shock protein (hsp) in inflamed joints and subcutaneous nodules of RA patients. *Scand. J. Immunol.* **31**:283–288, 1990.

Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, and Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **179**:1517–1527, 1994.

Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, and Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes melitus. *J. Clin. Invest.* **89**:283–292, 1992.

Kaufmann SH, Ewing CM, and Sharper JH. The erasable western blot. *Anal. Biochem.* **161**:85–89, 1987.

Kaufmann SHE. Heat shock proteins and autoimmunity: a critical appraisal. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **103**:317–322, 1994.

Kavanaugh AF, Lightfoot E, Lipsky PE, and Oppenheimer-Marks N. Role of CD11/CD18 in adhesion and transendothelial migration of T cells. Analysis utilizing CD18-deficient T cell clones. *J. Immunol.* **146**:4149–4156, 1991.

- Kawabe Y, and Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8+ CD4+ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* **349**:245–248, 1991.
- Kawaguchi Y, Harigai M, Kitani A, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, Hidaka T, Hara M, Kawagoe M, and Nakamura H. Effect of prolyl 4-hydroxylase inhibitor on fibroblast collagen production *in vitro*: an approach to the treatment of systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* **19**:1710–1715, 1992b.
- Kawaguchi Y, Kitani A, Hara M, Harigai M, Hirose T, Suzuki K, Kawakami M, Hidaka T, Ishizuka T, Kawagoe M, and Nakamura H. Cytokine regulation of prolyl 4-hydroxylase production in skin fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis: contribution to collagen synthesis and fibrosis. *J. Rheumatol.* **19**:1195–1201, 1992a.
- Kawasaki H, Emori Y, and Suzuki K. Calpastatin has two distinct sites for interaction with calpain: effect of calpastatin fragments on the binding of calpain to membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**:467–472, 1993.
- Keat A. TB or not TB?: that is the question. *Brit. J. Rheumatol.* **32**:769–771, 1993.
- Kemeny DM. Titration of antibodies. *J. Immunol. Meth.* **150**:57–76, 1992.
- Keystone EC, Rittershaus C, Wood N, Snow KM, Flatow J, Purvis JC, Poplonski L, and Kung PC. Elevation of a $\gamma\delta$ T cell subset in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **84**:78–82, 1991.

- Khalife J, Trottein F, Schacht AM, Godin C, Pierce RJ, and Capron A. Cloning of the gene encoding a *Schistosoma mansoni* antigen homologous to human Ro/SS-A autoantigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**:193–202, 1993.
- Kingsley G, Pitzalis C, Kyriazis N, and Panayi GS. Abnormal helper-inducer/suppressor-inducer T-cell subset distribution and T-cell activation status are common to all types of chronic synovitis. *Scand. J. Immunol.* **28**:225–232, 1988.
- Kirstein H, and Mathiesen. Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **16**:331–337, 1987.
- Kivirikko KI, Myllylä R, and Pihlajaniemi T. Protein hydroxylation: prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. *FASEB J.* **3**:1609–1617, 1989.
- Kjeldsen-Kragh J, Qayle A, Kalvenes C, Førre Ø, Sørskaar D, Vinje O, Thoen J, and Natvig JB. T γ δ cells in juvenile rheumatoid arthritis and rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* **32**:651–660, 1990.
- Koivu J, Myllylä R, Helaakoski T, Pihlajaniemi T, Tasanen K, and Kivirikko KI. A single polypeptide acts both as the β subunit of prolyl 4-hydroxylase and as a protein disulfide-isomerase. *J. Biol. Chem.* **262**:6447–6449, 1987.
- Kollias G. Tumor necrosis factor: a specific trigger in arthritis. *Res. Immunol.* **144**:342–347, 1993.

Konttinen YT, Bluestein HG, and Zvaifler NJ. Regulation of the growth of Epstein Barr virus infected B cells: temporal profile of the in vitro development of three distinct cytotoxic cells. *Cell Immunol.* **103**:84–95, 1986.

Koopman WJ, and Gay S. Do nonimmunologically mediated pathways play a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **19**:107–122, 1993.

Krane SM, and Simon LS. Rheumatoid arthritis: clinical features and pathogenic mechanisms. *Med. Clin. N. Am.* **70**:263–284, 1986.

Krane SM, Conca W, Stephenson ML, Amento EP, and Goldring MB. Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **580**:340–354, 1990.

Krane SM. Mechanisms of tissue destruction in rheumatoid arthritis, *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. 12th Edition. Edited by DJ. McCarty, WJ. Koopman. Lea & Febiger, Philadelphia, London. 763–779, 1993.

Kroemer G, and Martínez-A C. The fail-safe paradigm of immunological self-tolerance. *Lancet* **338**:1246–1249, 1991.

Kroemer G, and Martínez-A. C. Mechanisms of self tolerance. *Immunol. Today* **13**:401–404, 1992.

Kroemer G, Brezinschek HP, Faessler R, Schauenstein K, and Wick G. Physiology and pathology of an immunoendocrine feedback loop. *Immunol. Today* **9**:163–165, 1988.

Kroemer G, Cuende E, and Martinez C. Compartmentalization of the peripheral immune system. *Adv. Immunol.* **53**:157–216, 1993.

Kronenberg M. Self-tolerance and autoimmunity. *Cell* **65**:537–542, 1991.

Kuutti-Savolainen ER, Kivirikko KI, and Laitinen O. Serum immunoreactive prolyl hydroxylase in inflammatory rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **39**:217–221, 1980.

Labbaye C, Musette P, and Cayre YE. Wegener autoantigen and myeloblastin are encoded by a single mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:9253–9256, 1991.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685, 1970.

Lafyatis R, Flipo RM, Duquesnoy B, and Capron A. Antibodies in rheumatoid synovial fluids bind to a restricted series of protein antigens in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* **35**:1016–1027, 1992.

Lamb JR, Zanders ED, Sewell W, Crumpton MJ, Feldmann M, and Owen MJ. Antigen-specific T cell unresponsiveness in cloned helper T cells mediated

via the CD2 or CD3/Ti receptor pathways. *Eur. J. Immunol.* **17**:1641–1644, 1987.

Larsson P, Kleinau S, Holmdahl R, and Klareskog L. Homologous type II collagen–induced arthritis in rats: characterization of the disease and demonstration of clinically distinct forms of arthritis in two strains of rats after immunization with the same collagen preparation. *Arthritis Rheum.* **33**:693–701, 1990.

Lazure C, Saayman HS, Naudé RJ, Oelofsen W, and Chrétien M. Ostrich MSEL–neurophysin belongs to the class of two–domain "big" neurophysin as indicated by complete amino acid sequence of the neurophysin/copeptin. *Int. J. Pep. Prot. Res.* **33**:46–58, 1989.

Lee YC. High–performance anion–exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Anal. Biochem.* **189**:151–162, 1990.

Leiter EH. The genetics of diabetes susceptibility in mice. *FASEB J.* **3**:2231–2241, 1989.

Lenarcic B, Gabrijelcic D, Rozman B, Drobnic–Kosorok M, and Turk V. Human cathepsin B and cystein proteinase inhibitors (CIPs) in inflammatory and metabolic joint diseases. *Biol. Chem. Hoppe–Seyer* **369**(suppl.):257–261, 1988.

Lerner MR, and Steitz JA. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5495–5499, 1979.

- Liao NS, Bix M, Zijlstra M, Jaenisch R, and Raulet D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* **253**:199–202, 1991.
- Life PF, Bassey EOE, and Gaston HJS. T-cell recognition of bacterial heat shock proteins in inflammatory arthritis. *Immunol. Rev.* **121**:113–135, 1991.
- Lin RH, Mamula MJ, Hardin JA, and Janeway CA Jr. Induction of autoreactive B cells allows priming of autoreactive T cells. *J. Exp. Med.* **173**:1433–1439, 1991.
- Lindstrom JM, Seybold ML, Lennon ML, Whittingham S, and Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in MG: prevalence, clinical correlates and diagnostic value. *Neurology* **26**:1054–1059, 1976.
- Linker-Israeli M, Quismorio FP Jr., and Horwitz DA. CD8⁺ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4⁺ cells to support anti-antibody synthesis. *Arthritis Rheum.* **33**:1216–1225, 1990.
- Lipsky PE, Davis LS, Gush JJ, and Oppenheimer-Marks M. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* **11**:123–162, 1989.
- Lo D, Freedman J, Hesse S, Brinster RL, and Sherman L. Peripheral tolerance in transgenic mice: tolerance to class II MHC and non-MHC transgene antigens. *Immunol. Rev.* **122**:87–102, 1991.

- Lobo-Yeo A, and Lamb JR. Superantigens as immunogens and tolerogens. *Clin. Exp. Rheumatol.* **11**(suppl.8):S17-S21, 1993.
- Lock RJ. Detection of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *J. Clin. Pathol.* **47**:4-8, 1994.
- Lu J, Willis AC, and Sim RB. A calreticulin-like protein co-purifies with a 60 kD component of Ro/SSA, but is not recognized by antibodies in Sjogren's syndrome sera. *Clin. Exp. Immunol.* **94**:429-434.
- Luqmani R, Gordon C, and Bacon P. Clinical pharmacology and modification of autoimmunity and inflammation in rheumatic disease. *Drugs* **47**:259-285, 1994.
- Lux FA, McCauliffe DP, Buttner DW, Lucius R, Capra JD, Sontheimer RD, and Lieu TS. Serological cross-reactivity between a human Ro/SS-A autoantigen (calreticulin) and the lambda Ral-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *J. Clin. Invest.* **89**:1945-1951, 1992.
- Maciewicz RA, and Etherington DJ. Enzyme immunoassay for cathepsins B and L in synovial fluids from patients with arthritis. *Biochem. Soc. Trans.* **16**:812-813, 1988.
- Maciewicz RA, Wotton SF, Etherington DJ, and Duance VC. Susceptibility of the cartilage collagens type II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsin B and L. *FEBS Lett.* **269**:189-193, 1990.

- Maini RN, and Zyberk CP. The significance of CD5+ B cells in rheumatic diseases. *Scand. J. Rheumatol.* **76**(suppl.):237–242, 1988.
- Mamula MJ, Fatenejad S, and Craft J. B cells process and present lupus autoantigens that initiate autoimmune T cell response. *J. Immunol.* **152**:1453–1461, 1994.
- Mamula MJ, Lin RH, Janeway CA Jr., and Hardin JA. Breaking T cell tolerance with foreign and self co-immunogens. A study of autoimmune B and T cell epitopes of cytochrome c. *J. Immunol.* **149**:789–795, 1992.
- Mamula MJ. The inability to process a self-peptide allows autoreactive T cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* **177**:567–571, 1993.
- Manicourt HD, Triki R, Fukuda K, Devogelaer JP, de Deuxchaisn CG, and Thonar EJMA. Levels of circulating TNF α and IL-6 in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **36**:490–499, 1993.
- Marrack P, and Kappler J. The spaphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* **248**:705–711, 1990.
- Marrack P, Hugo P, McCormack J, and Kappler J. Death and T cells. *Immunol. Rev.* **133**:119–129, 1993.
- Masi AT, and Feigenbaum SL. Seronegative rheumatoid arthritis. Fact or fiction? *Arch. Intern. Med.* **143**:2167–2172, 1983.

Matsudaira P. Limited N-terminal sequence analysis. *Meth. Enzymol.* **182**:602–613, 1990.

Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**:10035–10038, 1987.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:991–1045, 1994.

McCachren SS, Haynes BF, and Nield JE. Localization of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridization histochemistry. *J. Clin. Immunol.* **10**:19–27, 1990.

McCachren SS. Expression of metalloproteinases and metalloproteinases inhibitor in human arthritic synovium. *Arthritis Rheum.* **34**:1085–1093, 1991.

McCarty GA, Valencia DW, and Fritzler MJ. *Antinuclear Antibodies. Contemporary Techniques and Clinical Application to Connective Tissue Diseases.* Oxford, Oxford University Press, 1984.

McCauliffe DP, and Sontheimer RD. Molecular characterization of the Ro/SS-A autoantigens. *J. Invest. Dermatol.* **100**:73S–79S, 1993.

McCulloch J, Lydyard PM, and Rook GAW. Rheumatoid arthritis: how well do the theories fit the evidence ? *Clin. Exp. Immunol.* **92**:1–6, 1993.

- McDermott M, and McDevitt H. The immunogenetics of rheumatic diseases. *Bull. Rheum. Dis.* **38**:1–10, 1988.
- McFarlin DE, and MacFarland H. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **307**:1183–1188, 1983.
- McHugh NJ. Systemic sclerosis: HLA antigens, autoantibodies and the brain. *Brit. J. Rheumatol.* **33**:305–306, 1994.
- McLachlan SM, and Rapoport B. The molecular biology of thyroid peroxidase: cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. *Endocr. Rev.* **13**:192–206, 1992.
- McLean L, Winrow V, and Blake D. Role of immunity to mycobacterial stress proteins in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Path.* **71**:295–303, 1990.
- McNeil HP, Chesterman CN, and Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv. Immunol.* **49**:193–280, 1991.
- Mellgren RL. Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at the cellular membrane? *FASEB J.* **1**:110–115, 1987.
- Merril CR, Goldman D, and Van Keuren ML. Gel protein stains: Silver stain. *Meth. Enzymol.* **104**:441–447, 1984.
- Miller JFAP, and Heath WR. Self-ignorance in the peripheral T cell pool. *Immunol. Rev.* **133**:131–150, 1993.

- Moiola L, Protti MP, McCormick D, Howard JF, and Conti-Tronconi BM. Myasthenia Gravis: residues of the α and γ subunits of muscle acetylcholine receptor involved in formation of immunodominant CD4⁺ epitopes. *J. Immunol.* **152**:4686–4698, 1994.
- Möller E, Böhme J, Valuggeri MA, Ridderstad A, and Olerup O. Speculation on mechanisms of HLA associations with autoimmune diseases and the specificity of "autoreactive" T lymphocytes. *Immunol. Rev.* **118**:5–19, 1990.
- Moore S. Pancreatic DNase. *The Enzymes*. Vol. **14A**. Boyer PD, Editor. Academic Press, NY, 1981.
- Moore TL, and Dorner RW. Rheumatoid factors. *Clin. Biochem.* **26**:75–84, 1993.
- Morgan K, Clague RB, Collins I, Ayad S, Phinn SD, and Holt PJJ. Incidence of antibodies to native and denatured cartilage collagens (type II, IX, and XI) and to type I collagen in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **46**:902–907, 1987.
- Morgan K. What do anti-collagen antibodies mean? *Ann. Rheum. Dis.* **49**:62–65, 1990.
- Morimoto C, Steinberg AD, Letvin NL, Hagan M, Takeuchi T, Daley J, Levine H, and Schlossman SF. A defect of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematosus patients demonstrated with anti-2H4 antibody. *J. Clin. Invest.* **79**:762–768, 1987.

Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, and Tan EM. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:1627–1631.

Moss PAH, Rosenberg WMC, and Bell JI. The human T cell receptor in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **10**:71–96, 1992.

Mountz JD, Gause WC, and Jonsson R. Murine models for systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* **3**:738–756, 1991.

Mountz JD, Zhou T, Long RE, Bluethmann H, Koopman WJ and Edwards CK 3rd. T cell influence on superantigen–induced arthritis in MRL–lpr/lpr mice. *Arthritis Rheum.* **37**:113–124, 1994.

Nagase H, and Woessner JF Jr. Role of endogeneous proteinases in degradation of cartilage matrix, *Joint Cartilage Degradation: Basic and Clinical Aspects*. Edited by JF. Woessner Jr., DS. Howell. Marcel Dekker, Inc. 159–185, 1993.

Nagayama Y, and Rapoport B. The thyrotropin receptor twenty–five years after its discovery: new insights following its molecular cloning. *Mol. Endocrinol.* **6**:145–156, 1992.

Nagle RB. A review of intermediate filament biology and their use in pathologic diagnosis. *Mol. Biol. Rep.* **19**:3–21, 1994.

Nagy ZA, Lehmann PV, Falcioni F, Muller S, and Adorini L. Why peptides ? their possible role in the evolution of MHC-restricted T-cell recognition. *Immunol. Today* **10**:132–138, 1989.

Nakamura MC, and Nakamura RM. Contemporary concepts of autoimmunity and autoimmune diseases. *J. Clin. Lab. Anal.* **6**:275–289, 1992.

Nakamura RM, and Binder WL. Current concepts and diagnostic evaluation of autoimmune disease. *Arch. Path. Lab. Med.* **112**:869–877, 1988.

Nakamura RM, and Tan EM. Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin. Lab. Med.* **12**:1–23, 1992.

Nakao H, Eguchi K, Kawakami A, Migita K, Otsubo T, Ueki Y, Shimomura C, Tezuka H, Matsunaga M, Maeda K, and Nagataki S. Phenotypic characterization of lymphocytes infiltrating synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis: analysis of lymphocytes isolated from minced synovial tissue by dual immunofluorescence staining. *J. Rheumatol.* **17**:142–148, 1990.

Naparstek Y, and Plotz PH. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:79–104, 1993.

Nemazee D, and Bürki K. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:8039–8043, 1989b.

- Nemazee D, and Bürki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**:562–566, 1989a.
- Ng KC, Brown KA, Perry JD, and Holborow EJ. Anti-RANA antibody: a marker for seronegative and seropositive rheumatoid arthritis. *Lancet* **i**:447–449, 1980.
- Nguyen Q, Mort JS, and Roughley PJ. Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem. J.* **266**:569–573, 1990.
- Nienhuis R, and Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: the antiperinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.* **23**:302–305, 1964.
- Nikkari S, Luukkainen R, Mottonen T, Meurman O, Hannonen P, Skurnik M, and Toivanen P. Does parvovirus B19 have a role in rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* **53**:106–111, 1994.
- Nossal GJV. Negative selection of lymphocytes. *Cell* **76**:229–239, 1994.
- O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, Palmer E, Kubo R, and Born WK. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **57**:667–674, 1989.
- Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, and Medsger TA Jr. Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl. Clinical and immunogenic associations. *Arthritis Rheum.* **35**:1211–1217, 1992.

- Oldstone MBA. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* **50**:819–820, 1987.
- Olive C, Gatenby PA, and Serjeantson SW. Persistence of γ/δ T cell oligoclonality in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Immunol. Cell Biol.* **72**:7–11, 1994.
- Olive C, Gatenby PA, and Serjeantson SW. Variable gene usage of T-cell receptor γ - and δ -chain transcripts expressed in synovia and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **87**:172–177, 1992.
- Olmsted JB. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J. Biol. Chem.* **256**:11955–11957, 1981.
- Opdenakker G, and Van Damme J. Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine* **4**:251–258, 1992.
- Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT, Ramberg J, and Lipsky PE. Differential utilization of ICAM–1 and VCAM–1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**:2913–2921, 1991.
- Ordeig J, and Guardia J. Diagnostic value of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **11**:602–604, 1984.

- Paliard X, West SG, Lafferty JA, Clement JR, Kappler JW, Marrack P, and Kotzin BL. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* **253**:325–329, 1991.
- Panayi GS, Lanchbury JS, and Kingsley GH. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **35**:729–735, 1992.
- Panayi GS. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bri. J. Rheumatol.* **32** (Suppl. 1): 4–14, 1993.
- Parish LC. An historical approach to the nomenclature of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **6**:138–158, 1963.
- Parker DC, and Eynon EE. Antigen presentation in acquired immunological tolerance. *FASEB J.* **5**:2777–2784, 1991.
- Patrick J, and Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* **180**:871–872, 1973.
- Paul WE, and Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**:241–251, 1994.
- Paulus HE, Machleder HI, Levine S, Yu DTY, and MacDonald NS. Lymphocyte involvement in rheumatoid arthritis: studies during thoracic duct drainage. *Arthritis Rheum.* **20**:1249–1262, 1977.

Pelletier JP, Haraoui B, and Martel-Pelletier J. Modulation of cartilage degradation in arthritic diseases by therapeutic agents, *Joint Cartilage Degradation: Basic and Clinical Aspects*. Edited by JF. Woessner Jr., DS. Howell. Marcel Dekker, Inc. 503–528, 1993.

Pereira P, Bandeira A, Coutinho A, Marcos MA, Toribio M, and Martinez C. V-region connectivity in T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 7:209–249, 1989.

Petrányi GG. Cellular and humoral suppression in transplantation. *Immunol. Today* 13:A25–26, 1992.

Pietropaolo M, Castaño L, Babu S, Buelow R, Kuo YLS, Martin S, Martin A, Powers AC, Prochazka M, Naggert J, Leiter EH, and Elisenbarth GS. Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). *J. Clin. Invest.* 92:359–371, 1993.

Pihlajaniemi T, Helaakoski T, Tasanen RM, Huhtala ML, Koivu J, and Kivirikko KI. Molecular cloning of the β -subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO J.* 6:643–649, 1987.

Pitkeathly DA, and Taylor G. Antinuclear factor in rheumatoid arthritis and related diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 26:1–9, 1967.

Pitzalis C, Kingsley GH, Haskard DO, and Panayi GS. The preferential accumulation of helper-inducer T lymphocytes in inflammatory lesions:

evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion. Eur. J. Immunol. **18**:1397–1404, 1988.

Pitzalis C, Kingsley GH, Lanchbury SS, Murphy J, and Panayi GS. Expression of HLA-DR, DQ and DP antigens and IL-2 receptor on synovial fluid T lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis: evidence for a "frustrated" activation. J. Rheumatol. **14**:662–666, 1987.

Plotz PH. The role of autoantigens in the induction and maintenance of autoimmunity. Molec. Biol. Reports **16**:127–132, 1992.

Poole RA. Cartilage in health and disease, Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology. 12th Edition. Edited by McCarty DJ, and Koopman WJ. Lea & Fabiger, Malvern, PA. pp. 279–333, 1993.

Portanova JP, Arndt RE, Tan EM, and Kotzin BL. Anti-histone antibodies in idiopathic and drug-induced lupus recognize distinct intrahistone regions. J. Immunol. **138**:446–451, 1987.

Potts AJ, Croall DE, and Hemler ME. Proteolytic cleavage of the integrin β_4 subunit. Exp. Cell Res. **212**:2–9, 1994.

Prchal JT, Morley BJ, Yoon SH, Coetzer TL, Palek J, Conboy JG, and Kan YW. Isolation and characterization of cDNA clones for human erythrocyte β -spectrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**:7468–7472, 1987.

- Pricher H, Hoffmann RU, Moskophidis D, Zinkernagel RM, and Hengartner H. Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* **351**:482–485, 1991.
- Pruijn GJ, Bozic B, Schoute F, Rokeach LA, and van Venrooij WJ. Refined definition of the 56 kD and other autoantigens in the 50–60 kDa region. *Mol. Biol. Rep.* **16**:267–276, 1992.
- Pugliese A, Bugawan T, Moromisato R, Awdeh ZL, Alper CA, Jackson RA, Erlich HA, and Eisenbarth GS. Two subsets of HLA-DQA1 alleles mark phenotypic variation in levels of insulin autoantibodies in first degree relatives at risk for insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **93**:2447–2452, 1994.
- Quill H, Bhandoola A, Trinchieri G, Haluskey J, and Peritt D. Induction of interleukin 12 responsiveness is impaired in anergic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **179**:1065–1070, 1994.
- Rambukkana A, Das PK, Witkamp L, Yong S, Meinardi MM, and Bos JD. Antibodies to mycobacterial 65-kDa heat shock protein and other immunodominant antigens in patients with psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **100**:87–92, 1993.
- Ramsdell R, and Folkes. Clonal deletion versus clonal anergy. The role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* **248**:1342–1348, 1990.

Reichlin M, and Reichlin MW. Autoantibodies to the Ro/SSA particle react preferentially with the human antigen. *J. Autoimmunity* **2**:359–365, 1989.

Reichlin M, Martin A, Taylor–Albert E, Tsuzaka K, Zhang W, Reichlin MW, Koren E, Ebling FM, Tsao B, and Hahn BH. Lupus autoantibodies to native DNA cross-react with the A and D sn RNP polypeptides. *J. Clin. Invest.* **93**:443–449, 1994.

Reife RA, Stuart JM, and Hasty KA. Pathological cartilage degradation in human arthritides, *Joint Cartilage Degradation: Basic and Clinical Aspects*. Edited by JF. Woessner Jr., DS. Howell. Marcel Dekker, Inc. 409–433, 1993.

Reveille JD. The molecular genetics of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* **3**:722–730, 1991.

Richter W, Shi Y, and Baekkeskov S. Autoreactive epitopes defined by diabetes-associated human monoclonal antibodies are localized in the middle and C-terminal domains of the smaller form of glutamate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2832–2836, 1993.

Robinson DR, Tashjian AH, and Levine L. Prostaglandin-stimulated bone resorption by rheumatoid synovia: a possible mechanism for bone destruction in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **56**:1181–1188, 1975.

Rocha B, and von Boehmer H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* **251**:1225–1228, 1991.

Rokeach LA, Haselby JA, and Hoch SO. Molecular cloning of a cDNA encoding the human Sm-D autoantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:4832–4836, 1988.

Rokeach LA, Haselby JA, Meilof JF, Smeenck RJ, Unnasch TR, Greene BM, and Hoch SO. Characterization of the autoantigen calreticulin. *J. Immunol.* **147**:3031–3039, 1991.

Rönnelid J, Lysholm J, Engström-Laurent A, Klareskog L, and Heyman B. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum.* **37**:1023–1029, 1994.

Rook G, Lydyard P, and Stanford J. Mycobacteria and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **33**:431–435, 1990.

Rook GAW, Lydyard PM, and Stanford JL. A reappraisal of the evidence that rheumatoid arthritis and several other idiopathic diseases are slow bacterial infections. *Ann. Rheum. Dis.* **52**:S30–S38, 1993.

Rook GWA, and Stanford JL. Slow bacterial infections or autoimmunity. *Immunol. Today* **13**:160–164, 1992.

Rose HM, Ragan C, Pearce E, and Lipman MO. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **68**:1–6, 1949.

- Rose LM, Latchman DS, and Isenberg DA. BCL-2 and FAS, molecules which influence apoptosis. A possible role in systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity* **17**:271–278, 1994.
- Rose NR, and Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today* **14**:426–430, 1993.
- Rose NR. The discovery of thyroid autoimmunity. *Immunol. Today* **12**:167–168, 1991.
- Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, and Carson DA. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5104–5108, 1989.
- Rounds MA, Kopaciewicz W, and Regnier FE. Factors contributing to intrinsic loading capacity in silica-based materials for preparative anion-exchange protein chromatographie. *J. Chromatography* **362**:187–196, 1986.
- Routsias JG, Tzioufas AG, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, and Moutsopoulos HM. Calreticulin synthetic peptide analogues: anti-peptide antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **91**:437–441, 1993.
- Rozzo SJ, Drake CG, Chiang BL, Gershwin ME, and Kotzin BL. Evidence for polyclonal T cell activation in murine models of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **153**:1340–1351, 1994.

- Rubin LA, and Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann. Int. Med.* **113**:619–627, 1990.
- Saido TC, Sorimachi H, and Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological–pathological involvement. *FASEB J.* **8**:814–822, 1994.
- Saitoh H, Tomkiel J, Cooke CA, Ratrie III H, Maurer M, Rothfield NF, Earnshaw WC. CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* **70**:115–125, 1992.
- Saitta MR, and Keene JD. Molecular biology of nuclear autoantigens. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **18**:283–310, 1992.
- Salmon M. The immunogenetic component of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **4**:342–347, 1992.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sanchez A, Ossorio C, Alvaro-Gracia JM, Padilla R, and Avila J. A subset of antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus react with vimentin and DNA. *J. Rheumatol.* **17**:205–209, 1990.
- Sanger F, Miklen S, and Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463–5467.

- Sano H, Hla T, Maier JAM, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, and Wilder RL. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J. Clin. Invest.* **89**:97–108, 1992.
- Sarin A, Clerici M, Blatt SP, Hendrix CW, Shearer GM, and Henkart PA. Inhibition of activation-induced programmed cell death and restoration of defective immune responses of HIV⁺ donors by cyteine protease inhibitors. *J. Immunol.* **153**:862–872, 1994.
- Saxne T, Palladino MA Jr., Heinegard D, Talal N, and Wollheim FA. Detection of tumor necrosis factor α but not tumor necrosis factor β in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum.* **31**:1041–1045, 1988.
- Schattner A. Lymphokines in autoimmunity– a critical review. *Clin. Immunol. Immunopath.* **70**:177–189, 1994.
- Schatz D, Krischer J, Horne G, Riley W, Spillar R, Silverstein J, Winter W, Muir A, Derovanesian D, Shah S, Malone J, and Maclaren N. Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives. *J. Clin. Invest.* **93**:2403–2407, 1994.
- Schiffenbauer J, Johnson HM, Butfilowski EJ, Wegrzyn L, and Soos JM. Staphylococcal enterotoxins can reactive experimental allergy encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8543–8546, 1993.

Schild H, Rotzschke O, Kalbacher H, and Rammensee HG. Limit of T cell tolerance of self proteins by peptide presentation. *Science* **247**:1587– , 1990.

Schonbeck S, Cherstel S, and Hohlfield R. Myasthenia gravis: prototype of the antireceptor autoimmune disease. *Int. Rev. Neurobiol.* **32**:175–200, 1990.

Schönrich G, Kalinke U, Momburg F, Malissen M, Schmitt-Verhulst AM, Malissen B, Hämmerling GJ, and Arnold B. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* **65**:293–304, 1991.

Schrohenloher RE, and Koopman WJ. Rheumatoid factor, Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology. 12th Edition. Edited by DJ. McCarty, WJ. Koopman. Lea & Febiger, Philadelphia, London. 861–876, 1993.

Schwartz BD. HLA class II transgenic mice: the chance to unravel the basis of HLA class II associations with disease. *J. Exp. Med.* **180**:11–13, 1994.

Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* **248**:1349–1356, 1990.

Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**:1065–1068, 1992.

Schwartz RS, and Stollar BD. Heavy-chain directed B-cell maturation: continuous clonal selection beginning at the pre-B cell stage. *Immunol. Today* **15**:27–31, 1994.

Schwartz RS, and Stollar BD. Origins of anti-DNA autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **75**:321–327, 1985.

Sculley DG, Sculley TB, and Pope JH. Reactions of sera from patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and infectious mononucleosis to Epstein-Barr virus-induced polypeptides. *J. Gen. Virol.* **67**:2253–2258, 1986a.

Sculley TB, Pope JH, and Hazelton RA. Correlation between the presence of antibodies to the Epstein-Barr virus nuclear antigen type 2 and antibodies to the rheumatoid arthritis nuclear antigen in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **29**:964–970, 1986b.

Sculley TB, Sculley DG, and Pope JH. Identification of Epstein-Barr Virus-induced polypeptides in P3HR-1 cells by protein immunoblot. *J. Gen. Virol.* **66**:1113–1122, 1985.

Senecal JL, Ichiki S, Girard D, and Raymond Y. Autoantibodies to nuclear lamins and to intermediate filament proteins: natural, pathologic or pathogenic ? *J. Rheumatol.* **20**:211–219, 1993.

- Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, and Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* **67**:879–888, 1991.
- Sewell KL, and Trentham DE. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Lancet* **341**:283–286, 1993.
- Sherman MY, and Goldberg AL. Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**:71–77, 1992.
- Shuster AM, Gololobov GV, Kvashuk OA, Bogomolova AE, Smirnov IV, Gabibov AG. DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science* **256**:665–667, 1992.
- Silman AJ. Is rheumatoid arthritis an infectious disease? *Brit. Med. J.* **303**:200–201, 1991.
- Silverman SL, and Schumacher HR. Antibodies to Epstein–Barr viral antigens in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **24**:1465–1468, 1981.
- Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomès–Daudrix V, Vincent C, Salama G, and Serre G. The cytekeratin filament–aggregating protein filaggrin is the target of the so–called "antikeratin antibodies", autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **92**:1387–1393, 1993.

- Simpson RW, McGinty L, Simon L, Smith CA, Godzeski CW, and Boyd RJ. Association of parvoviruses with rheumatoid arthritis of humans. *Science* **223**:1425–1428, 1984.
- Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* **248**:1380–1388, 1990.
- Sioud M, Kjeldsen-Kragh J, Quayle A, Kalvenes C, Waalen K, Førre Ø, and Natvig JB. The V δ gene usage by freshly isolated T lymphocytes from synovial fluids in rheumatoid synovitis: a preliminary report. *Scand. J. Immunol.* **31**:415–421, 1990.
- Smith DB, and Johnson KS. Single-step purification of peptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**:31–40, 1988.
- Smith DE and Fisher PA. Identification, developmental regulation, and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: Application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose blots. *J. Cell. Biol.* **99**:20–28, 1984.
- Smith MD, Bröker B, Moretta L, Ciccone E, Grossi CE, Edwards JCW, Yüksel F, Colaco B, Worman C, Mackenzie L, Kinne R, Weseloh G, Glückert K, and Lydyard PM. T $\gamma\delta$ cells and their subsets in blood and synovial tissue from rheumatoid arthritis patients. *Scand. J. Immunol.* **32**:585–593, 1990.

Smolen JS, Hassfeld W, and Steiner G. Anti-RA33 – a new autoantibody characteristic of rheumatoid arthritis. *Isr. J. Med. Sci.* **26**:693–694, 1990a.

Smolen JS, Hassfeld W, Graninger W, and Steiner G. Antibodies to antinuclear subtypes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **8**(suppl.5): 41–44, 1990b.

Söderström K, Halapi E, Nilsson E, Grönberg A, van Embden J, Klareskog L, and Kiessling R. Synovial cells responding to a 65-kDa mycobacterial heat shock protein have a high proportion of a TCR $\gamma\delta$ subtype uncommon in peripheral blood. *Scand. J. Immunol.* **32**:503–515, 1990.

Sohen S, Romain PL, Rothstein DM, Yamane T, Tanaka S, Anderson P, Schlossman SF, and Morimoto C. Phenotypic abnormalities in CD8⁺ T lymphocyte subsets in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **18**:1649–1654, 1991.

Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C, Vives-Pi M, Fernández-Figueras MT, Ariza A, Gomis R, Bragado R, Martí M, Jaraquemada D, and Pujol-Borrell R. Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V β usage, and cytokin profile. *J. Immunol.* **153**:1360–1377, 1994.

Sontheimer RD, Lieu TS, and McCauliffe DP. Molecular characterization of the Ro/SS-A autoimmune response. *Sem. Dermatol.* **10**:199–205, 1991.

- Sottini A, Imberti L, Gorla R, Cattaneo R, and Primi D. Restricted expression of T cell receptor V β but not V α genes in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **21**:461–466, 1991.
- Southern E. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Meth. Enzymol.* **68**:152–176, 1979.
- Sprent J, and Webb SR. Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Adv. Immunol.* **41**:39–133, 1987.
- Squier MKT, Miller ACK, Malkinson AM, and Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **159**:229–237, 1994.
- Starger JM, Brown WE, Goldman AE, and Goldman RD. Biochemical and immunological analysis of rapidly purified 10-nm filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. *J. Cell Biol.* **78**:93–109, 1978.
- Steinberg AD, and Klinman DM. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **14**:25–41, 1988.
- Steinberg AD, Gouley MF, Klinman DM, Tsoko GC, Scott DE, and Krieg AM. NIH conference. Systemic lupus erythematosus. *Ann. Intern. Med.* **115**:548–559, 1991.
- Steinberg AD, Krieg AM, Gourley MF, and Klinman DM. Theoretical and experimental approaches to generalized autoimmunity. *Immunol. Rev.* **118**:129–163, 1990.

Steiner G, Hartmuth K, Skriner K, Maurer-Fogy I, Sinski A, Thalmann E, Hassfeld W, Barta A, and Smolen JS. Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *J. Clin. Invest.* **90**:1061–1066, 1992.

Steinert P, Zackroff R, Aynardi-Whitman M, and Goldman RD. Isolation and characterization of intermediate filaments. *Meth. Cell Biol.* **24**:399–419, 1982.

Steinman L. Autoimmune disease. *Sci. Am.* **269**:107–114, 1993.

Stuart JM, and Dixon FJ. Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* **158**:378–392, 1983.

Suzuki K, Saido TC, and Hirai S. Modulation of cellular signals by calpain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **674**:218–227, 1992a.

Suzuki K, Shimizu K, Hamamoto T, Nakagawa Y, Hamakubo T, and Yamamuro T. Biochemical demonstration of calpains and calpastatin in osteoarthritic synovial fluid. *Arthritis Rheum.* **33**:728–732, 1990.

Suzuki K, Shimizu K, Hamamoto T, Nakagawa Y, Murachi T, and Yamamuro T. Characterization of proteoglycan degradation by calpain. *Biochem. J.* **285**:857–862, 1992b.

- Swat W, von Boehmer H, and Kisielow P. Central tolerance: clonal deletion or clonal arrest ? *Eur. J. Immunol.* **24**:485–487, 1994,
- Tada T, Hu FY, Kishimoto H, Furutani–Seiki M, and Asano Y. Molecular events in the T cell–mediated suppression of the immune response. *Ann. New York Acad. Sci.* **636**:20–27, 1991.
- Takahashi T, Mafune K, and Maki T. Cloning of self–major histocompatibility complex antigen–specific suppressor cells from adult bone marrow. *J. Exp. Med.* **172**:901–909, 1990.
- Takano E, Ma H, Yang HQ, Maki M, and Hatanaka M. Preference of calcium–dependent interactions between calmodulin–like domains of calpains and calpastatin subdomains. *FEBS letters* **362**:93–97, 1995.
- Takeuchi T, Tanaka S, Steinberg AD, Matsuyama T, Daley J, Schlossman SF, and Mrimoto C. Defective expression of the 2H4 molecule after autologous mixed lymphocyte reaction activation in systemic lupus erythematosus patients. *J. Clin. Invest.* **82**:1288–1294, 1988.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, and Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **25**:1271–1277, 1982.
- Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* **44**:93–151, 1989.

- Tan EM. Autoimmunity and apoptosis. *J. Exp. Med.* **179**:1083–1086, 1994.
- Tan EM. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* **67**:841–842, 1991.
- Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H, Yoshioka T, and Sugimoto T. A sensitive and specific assay for granulocyte elastase in inflammatory tissue fluid using L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroanilide. *Clin. Chim. Acta* **187**:173–180, 1990.
- Targoff IN. Humoral immunity in polymyositis/dermatomyositis. *J. Invest. Dermatol.* **100**:116S–123S, 1993.
- Tarkowski A, Klareskog L, Carlsten H, Herberts P, Koopman WJ. Secretion of antibodies to types I and II collagen by synovial tissue cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **32**:1087–92, 1989.
- Taylor HG, Borg AA, and Dawes PT. Human parvovirus B19 and rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **11**:548–550, 1992.
- Taylor SA, Barbetti F, Accili D, Roth J, and Gorden P. Syndromes of autoimmunity and hypoglycemia. Autoantibodies directed against insulin and its receptor. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **18**:123–143, 1989.
- Teh HS, Kishi H, Scott B, and von Boehmer H. Deletion of autospecific T cells in T cell receptor (TCR) transgenic mice spares cells with normal TCR levels and low levels of CD8 molecules. *J. Exp. Med.* **169**:795–806, 1989.

- Theofilopoulos AN, and Dixon FJ. Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunol. Rev.* **55**:179–216, 1981.
- Tiegs SL, Russell DM, and Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* **177**:1009–1020, 1993.
- Tiwari JL, and Terasaki PI, editors. *HLA and Disease Associations*. Springer-Verlag, New-York. 463 pp., 1985.
- Tosato G, Steinberg AD, and Blaese RM. Defective EBV-specific suppressor T cell function in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **305**:1238–1243, 1981.
- Towbin H, and Gordon J. Immunoblotting and dot blotting: Current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* **72**:313–340, 1984.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350–4354, 1979.
- Trabandt A, Gay RE, Fassbender HG, and Gay S. Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **34**:1444–1451, 1991.
- Trentham DE, Belli JA, Anderson RJ, Buckley JA, Goetzl EJ, David JR, and Austen KF. Clinical and immunologic effects of fractionated total lymphoid irradiation in refractory rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **305**:976–982, 1981.

- Trentham DE, Townes AS, and Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* **146**:857–868, 1977.
- Trinchieri G. Recognition of major histocompatibility complex class I antigens by natural killer cells. *J. Exp. Med.* **180**:417–421, 1994.
- Tsay GJ, Fann RH, and Hwang J. Specificity of anti-Scl-70 antibodies in scleroderma: increased sensitivity of detection using purified DNA topoisomerase I from calf thymus. *J. Rheumatol.* **17**:1314–1319, 1990.
- Tsokos GC, and Balow JE. Cellular immune responses in systemic lupus erythematosus. *Prog. Allergy* **35**:93–161, 1984.
- Tsuzaka K, Fujii T, Akizuki M, Mimori T, Tojo T, Fujii H, Tsukatani Y, Kubo A, and Homma M. Clinical significance of antibodies to native or denatured 60-kD or 52-kD Ro/SS-A proteins in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **37**:88–92, 1994.
- Tzartos S, Kokla JA, Walgrave SL, and Conti-Tronconi BM. Localization of the main immunogenic region of human muscle acetylcholine receptor to residue 67–76 of the α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2899–2903, 1988.
- Uematsu Y, Wege H, Straus A, Ott M, Bannwarth W, Lanchbury J, Panyi G, and Steinmetz M. The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8534–8538, 1991.

- Vaes G. Cartilage and bone tissue damage in arthritis: cellular co-operation and enzymatic mechanisms. *Scand. J. Rheumatol.* **40**:65–71, 1981.
- Van Boxel JA, and Paget SA. Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membrane. *N. Engl. J. Med.* **293**:517–520, 1975.
- van de Weil BA, Dolman KM, van der Meer–Gerritsen CH, Hack CE, von dem Borne AE, and Goldschmeding R. Interference of Wegner's granulomatosis autoantibodies with neutrophil Proteinase 3 activity. *Clin. Exp. Immunol.* **90**:409–414, 1992.
- Van der Lubbe PA, Reiter C, Miltenburg AM, Krüger K, De Ruyter AN, Rieber EP, Bijl JA, Reithmüller G, and Breedveld FC. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric CD4 monoclonal antibody (cM–T412): immunopharmacological aspects and mechanisms of action. *Scand. J. Immunol.* **39**:286–294, 1994.
- van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, and The T.H. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* **i**:425–429, 1985.
- van Eden W, and de Vries RR. The immunopathogenesis and immunogenetics of rheumatoid arthritis. *Bri. J. Rheumatol.* **28**(Suppl. 1):51–53, 1989.
- van Eden W, Hogervorst EJM, Henssen EJ, Van der Zee R, van Embden JDA, and Cohen IR. A cartilage-mimicking T-cell epitope on a 65K mycobacterial

heat-shock protein: adjuvant arthritis as a model for human rheumatoid arthritis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **145**:27–43, 1989.

Van Regenmortel MHV. Protein antigenicity. *Molec. Biol. Reports* **16**:133–138, 1992.

van Rijthoven AWAM, Dijkmans BAC, Goei The HS, Hermans J, Montnor-Beckers ZL, Jacobs PC, and Cats A. Cyclosporin treatment for rheumatoid arthritis: a placebo controlled, double blind, multicentre study. *Ann. Rheum. Dis.* **45**:726–731, 1986.

Vaughan JH. Infection and rheumatic diseases: a review. *Bull. Rheum. Dis.* **39**:1–8, 1990.

Vincent C, Serre G, Lapeyre F, Fournié B, Ayrolles C, Fournié A, and Soleihavoup JP. High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called "antikeratin antibodies". *Ann. Rheum. Dis.* **48**:712–722, 1989.

Vivino FB, and Maul GG. Histologic and electron microscopic characterization of the antiperinuclear factor antigen. *Arthritis Rheum.* **33**:960–969, 1990.

Voller A, Bidwell DE, and Burek CL. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to thyroglobulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* **163**:402–405, 1980.

von Boehmer H, and Kisielow P. Self–nonself discrimination by T cells. *Science* **248**:1369–1373, 1990.

von Boehmer H. Positive selection of lymphocytes. *Cell* **76**:219–228, 1994.

Waler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **17**:172–188, 1940.

Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallick GS, and Lark MW. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum.* **35**:35–41, 1992.

Warner NB. Serologic tests for connective tissue diseases and the primary vasculitides. *Dermatol. Clin.* **12**:161–173, 1994.

Webb S, Morris C, and Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* **63**:1249–1256, 1990.

Weissman JS, and Kim PS. Efficient catalysis of disulfide bond rearrangements by protein disulfide isomerase. *Nature* **365**:185–188, 1993.

Wekerle H, and Lassmann H. *Contra*: Evidence against a primary lesion in the target organ in autoimmune disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **103**:328–331, 1994.

- Weng YM, McNeilage J, Topfer F, McCluskey J, and Gordon T. Identification of a human-specific epitope in a conserved region of the La/SS-B autoantigen. *J. Clin. Invest.* **92**:1104–1108, 1993.
- Westgeest AAA, Boerbooms AMT, Jongmans M, Vandenbroucke JP, Vierwinden G, and van de Putte LBA. Antiperinuclear factor: indicator of more severe disease in seronegative rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **14**:893–897, 1987.
- Westgeest AAA, van Loon AM, van der Logt JTM, van de Putte LBA, and Boerbooms AMT. Antiperinuclear factor, a rheumatoid arthritis specific autoantibody: Its relation to Epstein-Barr virus. *J. Rheumatology* **16**:626–630, 1989.
- Weyand CM, Oppitz U, Hicock K, and Goronzy JJ. Selection of T cell receptor V β elements by HLA-DR determinants predisposing to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **35**:990–998, 1992.
- White DG, Mortimer PP, Blake Dr, Woolf AD, Cohen BJ, and Bacon PA. Human parvovirus arthropathy. *Lancet* **1**:419–421, 1985.
- Wilkin TJ. *Pro*: Evidence for a primary lesion in the target organ in autoimmune disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **103**:323–327, 1994.
- Williams RC Jr., Staud R, Malone CC, Payabyab J, Byres L, and Underwood D. Epitopes on proteinase-3 recognized by antibodies from patients with Wegener's granulomatosis. *J. Immunol.* **152**:4722–4737, 1994.

- Williams RO, Feldmann M, and Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:9784–9788, 1992.
- Williams RO, Mason LJ, Feldmann M, and Maini RN. Synergy between anti-CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:2762–2766, 1994.
- Williams WV, Fang Q, Demarco D, Vonfeldt J, Zurier RB, and Weiner DB. Restricted heterogeneity of T cell receptor transcripts in rheumatoid synovium. *J. Clin. Invest.* **90**:326–333, 1992.
- Winchester R, Dwuer E, and Rose S. The genetic basis of rheumatoid arthritis. The shared epitope hypothesis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **18**:761–783, 1992.
- Winchester R. The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.* **56**:389–466, 1994.
- Winfield JB, and Jarjour WN. Stress proteins, autoimmunity, and autoimmune disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **167**:161–189, 1991.
- Wucherpfennig KW, Weiner HL, and Hafler DA. T-cell recognition of myelin basic protein. *Immunol. Today* **12**:277–282, 1991.
- Yamamoto S, Shimizu K, Shimizu K, Suzuki K, Nakagawa Y, and Yamamuro T. Calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in human arthritic synovial joints. *Arthritis Rheum.* **35**:1309–1317, 1992.

Yeatman N, Sachs J, and Bottazzo GF. Autoimmunity--towards the year 2001. *Immunol. Today* **13**:239–240, 1992.

Yokota S, Tsubaki K, Kuriyama T, Shimizu H, Ibe M, Mitsuda T, Aihara Y, Kosuge K, and Nomaguchi H. Presence in Kawasaki disease of antibodies to mycobacterial heat shock protein hsp65 and autoantibodies to epitopes of human hsp65 cognate antigen. *Immunol. Immunopathol.* **2**:163–170, 1993.

Youinou P, Berthelot JM, Péron A, Leroux AM, and Le Goff P. Anticorps anti-périnucléaires et antigènes correspondants. *Rev. Rhum. Mal. Ostéoartic.* **59**:43–51S, 1992.

Youinou P, Lamour A, Dueymes M. and Le Goff P. Infectious origin of rheumatoid arthritis. *Rev. Rhum.* **60**:30S–35S, 1993.

Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDG, Clark CJM, and Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Bri. Med. J.* **2**:97–99, 1979.

Young RA, and Davis RW. Efficient isolation of genes using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:1194–1198, 1983.

Young RA, and Davis RW. Yeast RNA polymerase II genes: Isolation with antibody probes. *Science* **222**:778–782, 1983.

Yui K, Ishida Y, Katsumata M, Komori S, Chused TM, and Abe R. Two separate mechanisms of T cell clonal anergy to Mls-1. *J. Immunol.* **151**:6062–6075, 1993.

- Zamvil SS, Nelson PA, Mitchell DJ, Knobler RL, Fritz RB, and Steinman L.
Encephalitogenic T cell clones specific for myeline basic protein. An unusual
bias in antigen recognition. J. Exp. Med. **162**:2107–2124, 1985.
- Zieve GW, and Sauterer RA. Cell biology of the snRNP particles. Crti. Rev.
Biochem. Mol. Biol. **25**:1–46, 1990.
- Zvaifler NJ. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis, Arthritis and Allied
Conditions: A Textbook of Rheumatology. 12th Edition. Edited by McCarty
DJ, and Koopman WJ. Lea & Febiger, Philadelphia, London. 723–736,
1993.
- Zwillich SH, and Lipsky PE. Molecular mimicry in the pathogenesis of rheumatic
diseases. Rheum. Dis. Clin. N. Am. **13**:339–352, 1987.

The Sa System: A Novel Antigen-Antibody System Specific for Rheumatoid Arthritis

NORMAND DESPRÉS, GILLES BOIRE, FRANCISCO JAVIER LOPEZ-LONGO, and HENRI-ANDRÉ MÉNARD

ABSTRACT. *Objective.* To describe a novel autoimmune system (Sa/anti-Sa) specific for rheumatoid arthritis (RA).

Methods. Antibodies were detected in immunoblots using human spleen and placenta extracts as antigens. Sera from 482 patients with various rheumatic diseases as well as from healthy controls were evaluated to define the disease associations of anti-Sa antibodies.

Results. Sera from 88 of 206 (42.7%) unselected patients with RA recognized specific protein bands (the Sa antigen) in immunoblots of spleen or placenta extracts, including 9 of 31 (29%) patients seen in the first few months after disease onset. Anti-Sa antibodies were found both in rheumatoid factor (RF) negative (17/63 or 27%) and in RF positive patients with RA (71/143 or 50%). They were nevertheless absent in RF positive patients with other connective tissue diseases (0/39). Antibodies to Sa were essentially found in sera from patients with RA (specificity 98.9%) being found only in 3 patients whose arthritides did not fulfill the ACR criteria. The positive predictive value of anti-Sa antibodies for RA was 96.7%, while its negative predictive value was 69.8%. Anti-Sa antibodies were predominantly of the IgG isotype, with titers varying from 1/50 to > 1/1000. The Sa antigen was characterized as a poorly soluble protein that is present in normal human tissues and that is distinct from all previously described RA associated autoimmune systems.

Conclusion. Anti-Sa antibodies are a novel serological marker highly specific for RA. Since anti-Sa antibodies occur independently of RF, they can be used as an additional diagnostic tool. The molecular nature of the Sa antigen as well as its potential pathogenic role in a significant proportion of patients with chronic articular inflammation of the rheumatoid variety merit further definition. (*J Rheumatol* 1994;21:1027-33)

Key Indexing Terms:
RHEUMATOID ARTHRITIS
AUTOANTIBODIES

ANTI-Sa ANTIBODIES
DISEASE SPECIFICITY

Autoantibodies are found in the sera of most patients with connective tissue diseases (CTD). Antibodies targeting specific DNA and RNA binding proteins characterize systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), polymyositis/dermatomyositis (PM/DM) and systemic sclerosis (SSc)¹. Antibodies to negatively charged phospholipids are associated with thromboembolic manifestations², while antibodies to mitochondrial and lysosomal enzymes are found in liver diseases³ and vasculitic syndromes⁴, respectively. In rheumatoid arthritis (RA), IgM rheumatoid factor (RF) has assumed a pivotal role in dividing patients into seropositive

and seronegative groups with different clinical manifestations and prognoses⁵. RF remains the best serological marker for RA despite our incomplete knowledge of its pathogenic role, its presence in only 70% of patients, its frequent absence in early stages of disease, and its lack of specificity⁶.

Because of the limitations of RF and because RA is such a heterogeneous disease, other potentially useful diagnostic or prognostic tools are needed. Several autoantibodies have been identified in rheumatoid sera⁷⁻¹¹. Their frequencies range from < 5% to > 80%, but all lack disease specificity. We describe a novel autoimmune system first identified using the serum of a patient named Savoie (Sa)¹². Our data indicate that anti-Sa antibodies are essentially restricted to and are found at high prevalence in the sera of patients with RA whether they are RF positive or negative. Anti-Sa antibodies frequently appear early in disease, and anecdotal observations suggest that titers may fluctuate with disease activity. The Sa system would thus appear to be a promising diagnostic tool for studying some of the events leading to the chronic evolutive polyarthritis that characterizes RA.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls. Our study included serum samples from 482 patients. Two hundred and six patients fulfilling the American College of Rheumatology (ACR) criteria for RA⁶ were diagnosed at the Rheumatic Diseases Unit of the Université de Sherbrooke and agreed to participate in a study

From the Rheumatic Diseases Unit, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, PQ, Canada.

Supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (HAM), a Studentship (ND), and a Clinical Associateship (GB) from The Arthritis Society, a Research Fellowship (FJL-L) from the Québec-Madrid exchange program, and a Chercheur-boursier (HAM) from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

N. Després, MSc; G. Boire, MD, MSc, Assistant Professor, Rheumatic Diseases Unit, Université de Sherbrooke (Because of their relative contribution, both N. Després and G. Boire should be considered as first authors); F.-J. Lopez-Longo, MD, Rheumatic Diseases Unit, Université de Sherbrooke, currently, Hospital General "Gregorio Marañon", 28007 Madrid, Spain; H.-A. Ménard, MD, Professor of Medicine, Rheumatic Diseases Unit, Université de Sherbrooke.

Address reprint requests to Dr. H.-A. Ménard, Rheumatology Division, CHU-Sherbrooke, 3001-12th Avenue N., Sherbrooke, PQ, Canada J1H 5N4.

Submitted July 20, 1993 revision accepted November 25, 1993.

on the clinical significance of autoantibodies in RA. Seven of these patients with RA also satisfied at least 4 criteria for SLE and another also fulfilled the criteria for SSC, including anti-Scl-70 antibodies. Since none of these 8 patients had anti-U1RNP antibodies, they were thus considered to have 2 concomitant diseases and not the mixed CTD (MCTD) type of overlap. A first control group included sera from 188 patients with various inflammatory rheumatic disorders: 68 patients with SLE, 24 with SSC, 16 with primary SS, 8 with MCTD (all with anti-U1RNP antibodies), 5 patients with PM/DM, 5 patients with discoid LE. 36 patients with undifferentiated CTD (UCTD), 24 patients with spondyloarthritis with prominent peripheral involvement (14 with psoriatic arthritis, and 10 with Reiter's syndrome/reactive arthritis), 1 patient with adult Still's disease, and 1 patient with polymyalgia rheumatica. A 2nd control group of 88 patients with non-inflammatory conditions included 42 elderly patients with osteoarthritis (OA), 36 healthy adults, and 10 young patients recovering from infectious mononucleosis. The presence of anti-EBNA (Epstein-Barr nuclear antigens) in these 10 convalescent sera was confirmed using EBNA anticompiment immunofluorescence (IF) (Organon Teknika, Scarborough, ON, Canada). All sera were separated at 37°C, coded, aliquoted, and stored at -20°C.

Reference antisera to Ro(SSA), La(SSB), U1RNP, Sm, Jo-1 and Scl-70 antigens were obtained from the Centers for Disease Control (CDC; Atlanta, GA). Anti-Sa positive reference sera were selected by their high reactivity in immunoblots (see below) and absence of reactivity towards other known autoantigens. The antiperinuclear factor (APF) reference serum from the Netherlands Red Cross Central Laboratory (Amsterdam, Netherlands) was a gift from Dr. A.A.A. Westgeest¹⁰. Sera positive and negative for anti-RA33 antibodies¹¹ were obtained from Dr. J. Smolen (Vienna, Austria) and tested blindly for anti-Sa. Reciprocally, we sent Dr. Smolen anti-Sa positive and negative RA sera to be tested blindly for anti-RA33.

Preparation of antigenic sources. Human spleen (HSE) and placenta extracts (HPE) were prepared from organs, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C or from fresh organs as described¹³ with some modifications. All procedures were done at 4°C, and all buffers were supplemented with 0.02% NaN₃, 1.5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 5 µg/ml each of chemostatin, leupeptin, antipain, and pepstatin. Briefly, tissues were homogenized in 4 volumes of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl (homogenization buffer). The homogenate was clarified by centrifugation and the supernatant mixed with preswollen diethylaminoethyl cellulose (DE 52, Whatman, Kent, England; 1 g/g of tissue) equilibrated with homogenization buffer. The bound proteins were eluted stepwise with Tris buffered saline (TBS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 150, 200, 250, and 300 mM NaCl. The fractions were dialyzed against distilled water, and the desalted extracts were freeze dried. For use as an antigenic control and as a molecular weight marker in immunoblots, normal human IgG was purified on Protein-A sepharose 6 MB (Pharmacia, Montréal, PQ, Canada) as described¹⁴.

Human HeLa and MOLT4 cells, initially obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD) were maintained at 37°C under 5% CO₂, in RPMI 1640 supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum, 60 µg/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin. Cells were collected by centrifugation and washed in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl (TBS). Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared from HeLa cells, as described¹¹. Total cell extracts were prepared by sonication at low intensity in NET-2 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40) followed by centrifugation at 13,000 × g for 15 min. The insoluble pellet and the supernatant were separately mixed with sample buffer (see below) and used in immunoblots.

Autoimmune serology. The methods used for the demonstration of RF (latex agglutination test), FANA (indirect IF [IIF] on HEP-2 cells), anti-dsDNA (radioimmunoassay using nick translated ³²P-DNA from lambda phage), anti-Sm, anti-U1RNP, anti-Ro(SSA), anti-La(SSB), anti-Jo-1, anti-PM/Scl, and anti-Scl-70 (double immunodiffusion [ID] in agarose using rabbit thymus extract and HSE) have all been described¹³. Antinuclear specificities were confirmed using commercial enzyme linked immunosorbent assays

(ELISA) (IAF Biochem, Montréal, PQ, Canada) and immunoprecipitation of cell extracts¹⁵. Immunoprecipitated nucleic acids or proteins were separated by electrophoresis and identified on autoradiograms.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting. HSE and HPE were electrophoresed in 15% discontinuous PAGE (acrylamide:bis; 36.5:1) under denaturing and reducing conditions (SDS-PAGE) as described¹³. HSE or HPE (10 mg/ml) were dissolved in sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 5% 2-mercaptoethanol), boiled for 3 min and layered across the top of slab gels. Electrophoresis was done using a Mini Protean II system (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA) at 150 V for 1 h at room temperature. Separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond, Amersham, Arlington Heights, IL) at 100 V for 1 h in 12.5 mM Tris, 96 mM glycine, pH 8.3 containing 20% methanol¹⁶. Prestained or biotinylated molecular weight markers were either from Amersham or Bio Rad. After saturation with 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS, membranes were incubated for 1 h with sera diluted in 150 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% Tween 20, 0.5% BSA (Buffer A) in a Miniblotter II apparatus (Immunetics, Cambridge, MA). All sera were screened against HSE or HPE at a dilution of 1/50, and positive reactions were confirmed at higher dilutions. A total of 97 randomly chosen sera (including 40 anti-Sa positive on HSE) were also tested against HPE. After extensive washing with Buffer A, nitrocellulose sheets were incubated with affinity purified biotinylated goat antihuman IgG (Fc) (or antihuman IgM in some experiments) followed by horseradish peroxidase conjugated streptavidin (both from Jackson Research Laboratories, West Grove, PA) each at a dilution of 1/2000 in Buffer A. Membranes were washed extensively with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1M NaCl, 0.1% Tween 20. Bands were developed in 10% methanol and 0.015% H₂O₂ using 4-chloro-1-naphthol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) as substrate. Sera were coded and the immunoblots read blind. All sera were tested at least twice; when the results were discordant for a given serum, the result of a 3rd test was the one recorded. Sera giving indeterminate results (i.e., very faint bands) were read as negative. To verify reproducibility, randomly chosen sera were retested at intervals with different antigenic preparations. In some experiments, specific anti-Sa antibodies were purified by immunofluorescence on nitrocellulose membrane strips using the acid elution technique¹⁷.

Enzymatic treatments. HSE was digested with enzymes that cleave nucleic acids, proteins, and sialic acid. Briefly, HSE (10 mg/ml) were incubated for 30 min at 37°C with 100 µg/ml RNase A (Calbiochem, San Diego, CA) or 400 µg/ml DNase I (Pharmacia) in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂ or with 100 µg/ml proteinase K (Sigma) in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.2% SDS. Enzymatic desialylation¹⁸ was carried out by the addition of solid sodium citrate to a final concentration of 0.1 M, pH 6.0 and incubation with 2 u/ml neuraminidase (Sigma) for 120 min at room temperature. Treated samples were added to sample buffer and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting.

IIF. A standard IIF assay was used throughout the study with several commercial FITC-antihuman IgG and/or IgM (Sanofi-Pasteur, Chaska, MN; Hoechst-Behring, Marburg, Germany). Sera were tested at dilutions of 1/5 to 1/100. As substrates, we used commercial preparations of HEP-2 cells (Sanofi-Pasteur and Immuno Concept Inc., Sacramento, CA), and commercial mouse kidney, liver, and stomach sections (Sanofi-Pasteur). Human buccal mucosa cells were obtained from an appropriate donor expressing the antigen recognized by APF¹⁰. Human peripheral blood leukocytes were isolated by gravity sedimentation in dextran followed by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation¹⁹.

RESULTS

Sera from patients with RA specifically recognize a 50 kDa antigen in immunoblots of HSE. The method used to obtain HSE was initially developed to detect anti-Ro(SSA) and anti-La(SSB) antibodies in human sera¹³. Most anti-Ro(SSA) sera defined by ID [identity with a precipitin formed by CDC

reference anti-Ro(SSA) serum] recognized a 60 kDa band in immunoblots of HSE (Figure 1A, Lanes 1 and 2). The 52 kDa Ro polypeptide was usually lost during HSE preparation because 52 kDa Ro elutes from DEAE at about 100 mM NaCl while Sa, 60 kDa Ro, and La proteins elute between 150 and 300 mM NaCl. Small amounts of contaminating 52 kDa Ro were still present in some HSE preparations, however, and anti-Ro sera containing high titers of anti-52 kDa Ro antibodies then weakly recognized a 52 kDa band (Figure 1A, Lane 1) while sera with low titers of anti-52 kDa Ro antibodies did not (Figure 1A, Lane 2). One serum that we used as a control anti-Ro serum in ID (the original Sa serum) recognized only a 50 kDa protein distinct from 52 kDa Ro (Figure 1A, Lane 3). This serum did not recognize any antigen in immunoblots of HeLa cell extracts under conditions where most anti-Ro sera recognized the 52 kDa Ro polypeptide in addition to classic 60 kDa Ro (data not shown). That the 50 kDa protein targeted by the Sa serum was distinct from 52 kDa Ro was further demonstrated when HSE devoid of 52 kDa Ro was used (Figure 1B). In Figure 1B, the serum in Lane 2 was the same as the one used in Lane 1 of Figure 1A, but no 52 kDa Ro band was detected in this particular HSE preparation. Antibodies in the original Sa serum recognized a 50 kDa band present in both HSE preparations, however. The absence of recognition of the

expected 60 kDa Ro band by the Sa serum was due to the presence in this serum of anti-Ro(SSA) antibodies only targeting conformational epitopes present on the nondenatured 60 kDa Ro(SSA) protein and absent on the corresponding SDS denatured polypeptide¹³. The 50 kDa protein recognized by the Sa serum was also clearly distinct from the La antigen (Figure 1A, Lane 5). We soon observed that other sera, devoid of anti-Ro(SSA) antibodies, also recognized the 50 kDa band (the Sa antigen) in immunoblots of HSE at titers varying from 1/50 to 1/1000 (Figure 1A, Lane 4, and Figure 2). These sera were thus called anti-Sa positive. Using special PAGE conditions (longer gels and lower voltage), the 50 kDa Sa antigen was shown to consist of a tight doublet of bands (Figure 1B, Lane 5). In addition, antibodies affinity purified on the Sa antigen specifically recognized the Sa antigen doublet (Figure 1B, Lane 4).

Unexpectedly, anti-Sa sera (including the original Sa serum) were almost exclusively from patients with RA (Table 1). Results of a typical Western blot are shown in Figure 2 to illustrate the characteristic banding pattern observed in screening conditions. Anti-Sa antibodies were present independently of RF because 17/63 (29%) seronegative patients with RA were anti-Sa positive. In addition, strongly RF positive sera from patients with other CTD were uniformly anti-Sa negative (see below). Finally, when IgG and HSE were

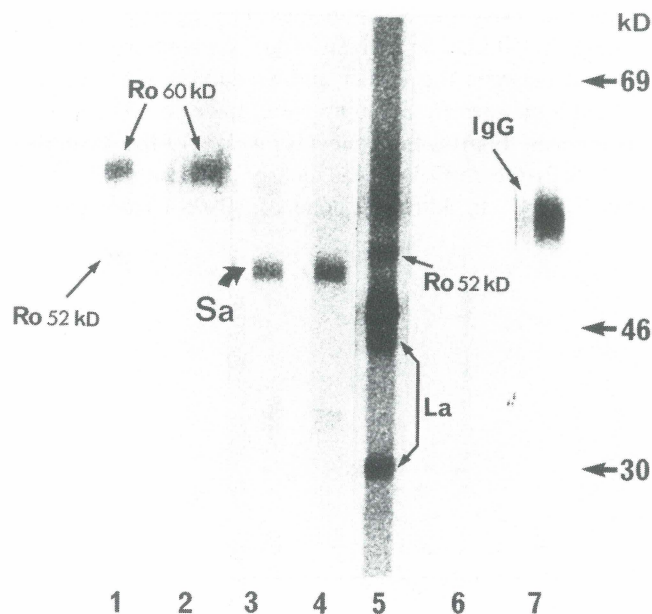


Fig. 1A. Specific recognition of 50 kDa polypeptide by prototype anti-Sa sera in immunoblots of HSE. HSE blotted on nitrocellulose (Lanes 1–6) was incubated with anti-Ro(SSA) sera (Lanes 1 and 2), the Sa serum (Lane 3) and anti-Ro negative serum from a patient with RA (Lane 4), an anti-Ro(SSA)/anti-La(SSB) serum (Lane 5), and normal human serum (Lane 6). Reduced human IgG (Lane 7) was only developed with the 2nd antibody (anti-IgG Fc fragment). It can be seen that the migration of the Sa antigen, recognized by anti-Sa sera in Lanes 3 and 4, differs from that of the other autoantigens and the heavy chain of IgG.

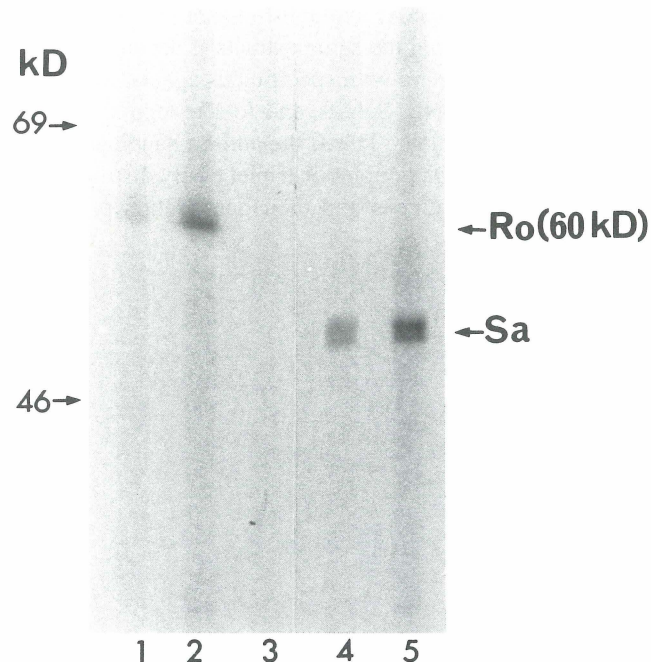


Fig. 1B. Immunoblot of HSE fractionated in SDS-PAGE under special conditions (longer gel, lower voltage). This particular HSE preparation did not contain contaminating 52 kDa Ro antigen as can be seen in Lane 2, where the serum shown in Lane 1 of Figure 1A was used. Lane 1 contains affinity-purified anti-60 kDa Ro antibodies. A prototype anti-Sa serum (Lane 5) and affinity purified anti-Sa antibodies (Lane 4) both recognize a tight doublet migrating at about 50 kDa. Lane 3: A normal human serum.

Table 1. *Anti-Sa antibodies in sera from 482 patients with rheumatic disease and controls*

Diagnostic Group*	N	Positive	%
RA	206	88	42.7
CTD	165	2	1.2
Seronegative/reactive polyarthritis	24	1	3.8
OA	41	0	0
Normal healthy controls	36	0	0
Infectious mononucleosis	10	0	0

* See Materials and Methods for a breakdown of each group and Results for details on patients without RA and positive for anti-Sa.

run side by side on SDS-PAGE and blotted with anti-Sa sera, Sa was easily differentiated from the heavy chain of IgG (Figure 1A, Lane 7).

Characterization of the Sa autoimmune system. Anti-Sa antibodies were predominantly of the IgG isotype. Although some sera also contained IgM anti-Sa, no serum was found to contain IgM anti-Sa without concomitant IgG. The Sa antigen was initially thought to represent either degraded or alternative forms of the well known snRNP bands [e.g., Ro(SSA), La(SSB), Sm or U1RNP] migrating in the 40 to 60 kDa region. This was shown not to be the case in view of several concordant observations. First, anti-Sa sera did not immunoprecipitate RNA or DNA from ³²P-labelled soluble extracts of sonicated HeLa cells (data not shown). In contrast, anti-Ro(SSA) and anti-Sm sera precipitated the appropriate RNA from the same extracts¹³. Second, none of the CDC reference sera with specificities against Ro(SSA), La(SSB), Sm, U1RNP, Scl-70, and Jo-1 recognized the Sa antigen in immunoblots. Third, the anti-Sa banding pattern consisted of a 50 kDa doublet or triplet easily distinguished from the snRNP antigens and their degradation products.

Fourth, anti-Sa sera failed to form precipitins in agarose when tested by ID using HSE as antigen. This was initially thought to result from the marked insolubility of the semi-purified antigen under nondenaturing conditions and/or to the low concentration of the Sa antigen in HSE. Increasing the concentration of soluble Sa antigen did not result in precipitation lines, making these explanations unlikely. Fifth, the 42.7% frequency in RA sera and the disease specificity of the anti-Sa antibodies (see below) were not consistent with any of these autoantibody systems.

The Sa system was distinct from described RA associated autoimmune systems^{7,9-11} as shown by the following experiments. First, 5 strongly anti-Sa positive and 5 anti-Sa negative RA sera were all negative when tested for anti-RA33 antibodies by Dr. J. Smolen^{11,21} (personal communication). Similarly, 2 of 5 anti-RA33 positive and 1 of 5 anti-RA33 negative sera contained anti-Sa antibodies. Second, the APF reference serum¹⁰ failed to recognize the Sa antigen in blots of HSE. Similarly, APF was found by IIF on cells from buccal mucosa in 7 of 10 anti-Sa positive as well as in 2 of 4 anti-Sa negative sera from patients with RA. This suggested that APF and anti-Sa antibodies are distinct systems that frequently coexist in rheumatoid sera. Third, anti-HaT-1 antibodies form characteristic precipitin lines in ID and recognize an antigen whose molecular weight in gel permeation chromatography is about 150 kDa⁹. The HaT-1 antigen has not been characterized in Western blot. No precipitins are formed in ID by anti-Sa antibodies reacting with HSE containing the 50 kDa Sa antigen. Thus, no similarity appears to exist between the HaT-1 and Sa autoimmune systems, although no specific attempts were made to confirm their differences. Fourth, the molecular weight of the Sa antigen in SDS-PAGE (50 kDa) was clearly different from the 70 kDa EBNA⁷. In addition, none of 10 sera from patients

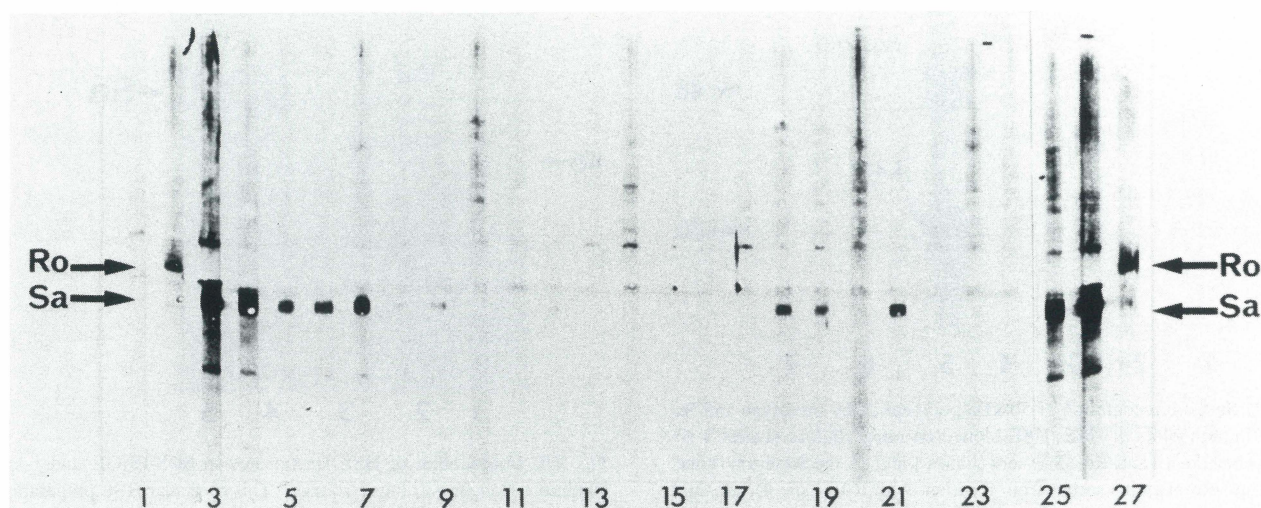


Fig. 2. Screening sera using immunoblots of HSE. The nitrocellulose sheet was incubated with 27 different sera: normal human serum (Lane 1), control anti-Ro(SSA) sera (Lanes 2 and 27), a control anti-Sa serum (Lanes 3 and 26), and 22 sera whose specificities were unknown (Lanes 4-25). All sera were tested at a 1/50 dilution. Lanes 3-9, 18, 19, 21, 25, and 26 gave the characteristic and reproducible banding pattern of anti-Sa antibodies. All positive sera were from patients with RA. Bands obtained with control sera serve as molecular weight markers.

recovering from an EBV infection blotted the Sa antigen, while all were positive for anti-EBNA antibodies.

Characterization of the Sa antigen. Splenic Sa antigen eluted from DEAE between 150 and 200 mM NaCl. To further characterize the Sa antigen, HSE extracts were treated with various enzymes. Treatments with RNase A, DNase I and neuraminidase did not affect the apparent molecular size or antigenicity of the Sa antigen in immunoblots, while proteinase K destroyed it (data not shown). Combined with the failure of anti-Sa sera to immunoprecipitate RNA or DNA from HeLa cell extracts, this suggested that the Sa antigen was a nonsialylated protein not associated with nucleic acids. In addition, anti-Sa sera failed to recognize any specific band in immunoblots of cytoplasmic and nuclear fractions of HeLa and MOLT 4 cells. Similarly, anti-Sa sera did not immunoprecipitate Sa from ³⁵S-labelled HeLa cells. IIF studies were attempted but revealed no consistent pattern of distribution on the various cell lines and tissues examined using whole sera or immunoaffinity purified antibodies. Using these methods the Sa antigen was not detectable in significant amounts in cultured cells.

The absence of Sa from cultured cells implied that characterization of the antigen depended on its purification from tissues. High yields of Sa antigen were only obtained from 30% of autopsy spleens, suggesting that the level of expression of the antigen differed between individuals or that subtle differences between spleens (e.g., elapsed time between death and autopsy or disease processes affecting the patient) affected the recovery of the antigen. Because human placentas are much easier to obtain than spleens, these were tested for the presence of the Sa antigen. Anti-Sa sera specifically recognized a polypeptide of 55 kDa in HPE, in addition to the polypeptide of about 50 kDa common to HSE and HPE (Figure 3). Placental Sa antigen eluted between 200 and 300 mM NaCl. To confirm the antigenic relationship between the Sa antigen from both tissues, antibodies were affinity purified on HSE and used on immunoblots of HPE (and vice versa). Complete crossreactivity between Sa antigens from both tissues was clearly demonstrated (Figure 3). In addition, all 40 sera that were anti-Sa positive on HSE gave a positive reaction also against the Sa antigen from HPE. In contrast to the erratic recovery of Sa from spleen, however, Sa antigen could be obtained from all placentas.

Anti-Sa antibodies are RA specific. The remarkable disease specificity of anti-Sa antibodies is documented in Table 1. In our cohort, the sensitivity of anti-Sa for RA is about 43% (Table 1). Anti-Sa antibodies were detected both in RF positive (50%) and RF negative patients with RA (27%) (Table 2), as well as in patients with positive and negative FANA (data not shown). Anti-Sa were not found in RF positive patients with CTD other than RA (0/39). The extremely high specificity of anti-Sa for RA (99%) was unexpected and rather perplexing. To date, no positive serum has been found from healthy controls or patients with nonautoimmune dis-

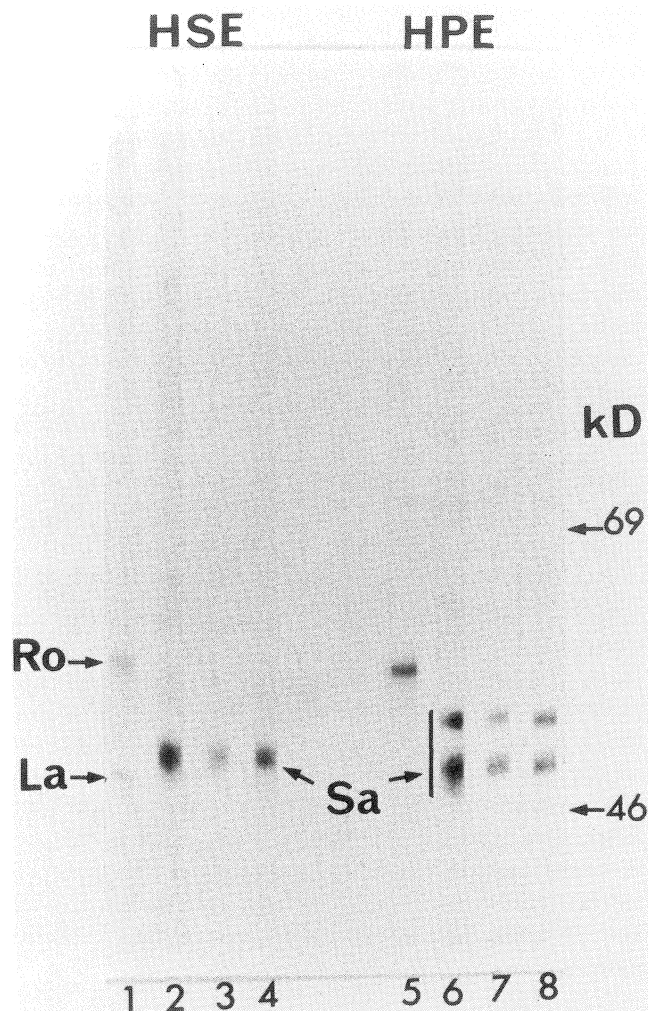


Fig. 3. Immunological crossreactivity of the Sa antigen from HSE and HPE. HSE (left) and HPE (right), blotted on nitrocellulose, were probed with the following sera and antibodies: An anti-Ro(SSA) and anti-La(SSB) serum (Lane 1), an anti-Sa positive RA serum (Lanes 2 and 6), antibodies affinity purified from immunoblots of HSE using the anti-Sa serum shown in Lanes 2 and 6 (Lanes 3 and 7), antibodies affinity purified from immunoblots of HPE using the anti-Sa serum shown in Lanes 2 and 6 (Lanes 4 and 8), and an anti-Ro(SSA) serum (Lane 5).

Table 2. Comparison of anti-Sa antibodies and of RF for the diagnosis of RA

	% Anti-Sa (n = 482)	% RF* (n = 375)
Sensitivity	42.7	69.4
Specificity	98.9	76.9
Pos. predictive value (PPV)	96.7	78.6
Neg. predictive value (NPV)	69.8	67.4

In 206 patients with RA, 143 were RF positive (71 with anti-Sa) and 63 were RF negative (17 with anti-Sa). In 276 patients with no RA, RF was positive in 39 (no anti-Sa), negative in 130 (3 had anti-Sa), and unknown in 107 (no anti-Sa).

* Assuming that RF was negative in all unknowns, sensitivity and PPV of RF would remain the same, but its specificity would increase to 85.9% and its NPV to 79.0%.

eases. Of the 10 patients with "other diseases" that produced anti-Sa antibodies, 4 fulfilled the ACR criteria for both RA and SLE, one fulfilled criteria for both RA and SSc, and 2 had a seropositive erosive polyarthritis with juvenile onset. These 7 patients are included in the RA group in Table 1. In addition, one patient had RA-like seronegative polyarthritis with psoriasis. This serum is included in the seronegative/reactive polyarthritis group in Table 1. Finally, 2 patients with UCTD were anti-Sa positive: one had nonerosive polyarthritis and one had nonerosive polyarthritis of recent onset accompanying cancer of the colon. Both patients are included in the CTD group in Table 1. In our population and using our most stringent criteria (i.e., counting as patients with RA only those without evidence of accompanying CTD), the presence of anti-Sa had a much better positive predictive value (96.7 vs 78.6%) and a similar negative predictive value (69.8 vs 67.4%) for RA (Table 2) than the presence of RF.

The global prevalence of anti-Sa in RA shown in Tables 1 and 2 was obtained with patients at various stages of their disease. Among the 31 patients in their first year of disease (recent onset), anti-Sa was found in 9 (29%). One such patient had serial clinical and serological evaluations from the onset and over many years. Her articular disease was successfully controlled with methotrexate, and the titers of anti-Sa progressively declined and became undetectable while RF persisted. Although anecdotal, this and several other observations suggested that, at least in some patients, titers of anti-Sa antibodies may vary over time with disease activity. This is currently being evaluated in an ongoing prospective study.

DISCUSSION

RA likely represents a syndrome encompassing multiple diseases with similar articular manifestations. Autoimmunity is a hallmark of the rheumatoid syndrome. By analogy with other CTD such as SLE, where specific autoantibodies are now used as diagnostic criteria²⁰, numerous autoantibodies have been identified in RA sera, most notably RF, anti-RA33, APF, RA nuclear antigens, anti-HaT-1, and anti-Ro(SSA). None have become recognized as entirely disease specific²¹. We describe an apparently new autoimmune system presenting 3 sets of unusual features. These may explain why the Sa system escaped earlier detection by the numerous investigators working with objectives similar to ours.

First, the detection of anti-Sa was initially strictly dependent on immunoblotting. In contrast to most described autoimmune systems, anti-Sa antibodies produced no precipitin in ID, nor did they give a definite IIF pattern. Development of a reliable ELISA or agglutination assay was impossible using crude extracts and whole sera. Similarly, immunoprecipitation was not appropriate in any system using tissue extracts and was negative using commonly available cell lines. This dependency on a single method of detection was

most probably due to the fact that immunoblotting is ideally suited for the specific recognition of an antigen in crude extracts. Using an antigen whose high pressure liquid chromatography purification has been monitored by immunoblot, a semiquantitative anti-Sa ELISA assay is now available²² and is currently being evaluated for mass screening. Second, preparation of semipurified Sa antigen in sufficient quantities was tedious and difficult. Since we had shown that anti-Ro(SSA) antibodies prominently target human-specific epitopes^{15,23}, we elected to use human tissues as antigenic sources to screen for new autoantigenic systems. The extraction procedure, initially designed to prepare extracts containing Ro(SSA) and La(SSB) antigens, may have been suboptimal for obtaining Sa. This appears to be the case at least in human spleen where about 3 of every 10 procedures were satisfactory. Furthermore, the Sa antigen did not appear to be present in any significant amounts in cultured cells. Preliminary results also suggested that nonhuman tissues (e.g., bovine placenta) were poorly crossreactive with human Sa protein (data not shown). Thus, unless one possessed very specific and high titered sera, the Sa system could easily have remained undetected, ignored, or discarded as a nonreproducible artifact. Sa antigen was later found to be present in all human placentas and in rheumatoid pannus (data not shown), facilitating the refinement of a purification protocol and the characterization of the system²². The antigen recognized by anti-Sa antibodies in placenta extracts consisted of a 55 kDa protein band in addition to a polypeptide of about 50 kDa common to both tissues. Although slightly different antigens may be present in different tissues, an alternative explanation for this observation may be that a lesser degree of degradation of the antigen takes place in tissues that are obtained fresh (such as placenta and pannus) compared to spleens obtained at autopsy. Indeed, the molecular weight of the Sa antigen decreased progressively, and the antigenicity decreased and finally disappeared when spontaneous degradation was allowed to proceed in HSE (data not shown). The relatedness of the Sa antigens from both tissues was shown using antibodies affinity purified from immunoblots. Indeed full immunologic crossreactivity between individual bands of Sa from a single tissue, as well as crossreactivity between antigens from different tissues was observed. In addition, all 40 sera shown to react with the Sa antigen from spleen that were tested against HPE were also shown to recognize Sa antigen from placenta. The Sa antigen thus appeared to be a normal constituent of human tissues. Third, antibodies to Sa were remarkably disease specific. Since RA is relatively neglected by investigators of the humoral autoimmune response (in comparison to SLE, for example), anti-Sa simply may not have been systematically investigated.

The targets of anti-Sa antibodies were 50 kDa nonsialylated polypeptides that did not appear to interact with nucleic acids. This distinguished Sa from a number of autoantigens¹. Although the pathogenic importance of the Sa system is

unknown, there are 4 lines of evidence supporting a significant role in RA. First, using the semipurified antigens and the immunoblotting technique described here, more than 40% of unselected patients with RA produced anti-Sa antibodies. Second, anti-Sa antibodies were virtually absent in sera from control patients with rheumatic disease and healthy controls. The very high specificity and positive predictive value of anti-Sa for RA suggested that these antibodies may complement (and possibly outperform) RF as a diagnostic tool. Whether this unusual specificity will hold in other patient populations or when using more sensitive assays remains to be confirmed, however. If it does, anti-Sa antibodies may represent a formidable tool for studying the pathogenic events leading to RA. Third, anti-Sa antibodies were present in the first few months after disease onset, being already detectable as IgG. This would be consistent with the hypothesis that an antigen driven immune response was in progress. The presence of high concentrations of Sa antigen in rheumatoid synovial tissue²² would increase the likelihood of the *in situ* formation of anti-Sa antibodies and would suggest a potential pathogenic role in the initiation or maintenance of the chronic destructive process observed in RA. Fourth, anecdotal observations suggest that titers of anti-Sa antibodies may fluctuate with disease activity or effective treatment. These features as well as the results of the characterization of the antigen distinguish Sa from all described autoimmune systems that have been associated with RA. These data may point the way to a better understanding of diagnosis and treatment of this disease.

ACKNOWLEDGMENT

We are indebted to the practitioners of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke for letting us study their patients, and to the technical and secretarial staff of the Rheumatic Diseases Unit of the Université de Sherbrooke for their respective contributions.

REFERENCES

1. Tan EM: Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989;44:93-151.
2. Love PE, Santoro SA: Anti-phospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990;112:682-98.
3. Berg PA, Klein R: Autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 1990;12:85-99.
4. Jennette JC, Falk RJ: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: A review. *Amer J Kidney Dis* 1990;15:517-29.
5. Koopman WJ, Schrohenloher RE: Rheumatoid factor. In: Utsinger PD, Zvaifler NJ, Ehrlich GE, eds. *Rheumatoid Arthritis. Etiology, Diagnosis, Management*. Philadelphia: Lippincott, 1985:217-42.
6. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
7. Billings PB, Hoch SD, White PJ, Carson DA, Vaughan JH: Antibodies to the Epstein-Barr virus nuclear antigen and to rheumatoid arthritis nuclear antigen identify the same polypeptide. *Proc Nat Acad Sci USA* 1983;80:7104-8.
8. Boire G, Ménard HA: Clinical significance of anti-Ro(SS-A) antibody in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1988;15:391-4.
9. Abe Y, Inada S, Torikai K: A new autoantibody in patients with rheumatoid arthritis: Characterization of the anti-HaT-1 antibody system. *Arthritis Rheum* 1988;31:135-9.
10. Westgeest AAA, van Loon AM, van der Logt JTM, van de Putte LBA, Boerbooms AMT: Antiperinuclear factor, a rheumatoid arthritis specific autoantibody: Its relation to Epstein-Barr virus. *J Rheumatol* 1989;16:626-30.
11. Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, et al: Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989;32:1515-20.
12. Ménard HA, Boire G, Lopez-Longo FJ, Lapointe S, Larose A: A novel antigen-antibody system restricted to rheumatoid arthritis patients: The Sa system (abstr). *Arthritis Rheum* 1989;(suppl)32:S105.
13. Boire G, Lopez-Longo FJ, Lapointe S, Ménard HA: Sera from patients with autoimmune diseases recognize conformational determinants on the 60 kDa Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum* 1991;34:722-30.
14. Goding JW: Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modifications to the standard methods. *J Immunol Methods* 1976;13:215-26.
15. Boire G, Craft J: Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. Analysis with sera specific for the Ro^{hY5} particle. *J Clin Invest* 1989;84:270-9.
16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
17. Kaufmann SH, Ewing CM, Sharper JH: The erasable Western blot. *Anal Biochem* 1987;161:89-95.
18. Daniel TO, Milfay DF, Escobedo J, Williams LT: Biosynthetic and glycosylation studies of cell surface platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* 1987;262:9778-84.
19. Proceedings of the First International Workshop on Antineutrophil Cytoplasm Antibodies. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1989;97:1-49.
20. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
21. Steiner G, Hartmuth K, Skrinier K, et al: Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *J Clin Invest* 1992;90:1061-6.
22. Després N, Boire G, Ménard HA: The rheumatoid arthritis specific Sa autoantigen is present in high concentration in the target tissue (abstr). *Arthritis Rheum* 1992;(suppl)35:S72.
23. Reichlin M, Reichlin MW: Autoantibodies to the Ro/SSA particle react preferentially with the human antigen. *J Autoimmun* 1989;2:359-65.

Detection And Expression of a cDNA Clone That Encodes a Polypeptide Containing Two Inhibitory Domains of Human Calpastatin and its Recognition by Rheumatoid Arthritis Sera

Normand Després, Guylaine Talbot, Bertrand Plouffe, Gilles Boire, and Henri A. Ménard

Rheumatic Diseases Unit, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Abstract

RA is the most frequent and most destructive inflammatory arthropathy. Rheumatoid factors, in spite of their lack of disease specificity, are important serological markers for RA and appear important in its immunopathogenesis as well. In search of more disease-specific autoimmune systems, we have screened a human placenta λ gt11 cDNA expression library using selected sera from patients with classical erosive RA. We have identified one clone (RA-1) that is recognized by three of five screening sera. The 950-bp insert shows a complete nucleotide sequence homology to the cDNA encoding the two COOH-terminal domains of calpastatin. The deduced open reading frame of the RA-1 cDNA predicts a 284-amino acid protein, with a calculated mol wt of 35.9 kD. Calpastatin is the natural inhibitor of calpains, which are members of the cysteine proteinases recently implicated in joint destruction in rheumatic diseases. The two domains encoded by the RA-1 clone each contain the structural features associated with the inhibitory activity of human calpastatin. By Western blotting, 45.5% or 21/44 RA sera specifically recognized both the fusion and the cleaved recombinant protein. This is in contrast to 4.7% (2/43) in nonrheumatoid sera and 0/10 in normal sera. Anticalpastatin autoantibodies could represent a disease-associated marker in chronic erosive arthritis of the rheumatoid type and could hypothetically play a dual pathogenic role, directly via an immune interference and indirectly through an immune complex mechanism. (*J. Clin. Invest.* 1995; 95:1891–1896.) Key words: autoantibody • autoantigen • molecular cloning • cysteine proteinase inhibitor • autoimmunity

Introduction

Many manifestations of autoimmune diseases are characterized by their association with specific autoantibodies. In systemic

lupus erythematosus, anti-dsDNA and anti-Sm autoantibodies can both serve as disease markers while only anti-dsDNA antibodies seem to have a pathogenic implication (1). In Graves' disease and myasthenia gravis, antibodies respectively targeting the thyroid-stimulating hormone and the acetylcholine receptors may actually drive the disease process (2, 3). Conversely, anti-thyroglobulin, antimicrosomal thyroid peroxidase, and anti-striated muscle autoantibodies appear to act only as disease markers.

Several autoantibodies have been reported to be more closely associated with RA (4–8). With the exception of rheumatoid factors, which are implicated in local immune complex formation and deposition, there is no evidence for a pathogenic role for these autoantibodies which may represent mere disease markers. A search for antigen–antibody systems more relevant to RA pathogenesis is thus warranted.

Isolation of cDNA clones encoding human proteins and peptides have been extensively used to identify new autoantigens (9). We undertook the immunoscreening of a human placenta λ gt11 expression library with a pool of sera from five chronic erosive rheumatoid factor positive RA patients. In this study, we report that these sera recognized a cDNA clone (RA-1)¹ encoding a protein corresponding to the two most COOH-terminal (residues 425–708) of the four inhibitory domains of calpastatin, the natural inhibitor of calpains (10). Calpains are calcium-dependent cysteine proteinases which are important intracellular activators in the signaling pathways and in triggering apoptosis (11, 12). They may also play a direct extracellular role in the destruction of connective tissue matrix and cartilage occurring in arthritic synovial joints (13). We also demonstrate that a significant proportion (45.5%) of RA patients produce antibodies against the purified recombinant protein encoded by RA-1. These observations allow us to hypothesize that immune interference with the natural inhibition of these proteinases may have implications in the severe erosive features observed in a subgroup of RA patients.

Methods

Sera and antibodies. Sera were obtained from 44 patients who fulfilled the American College of Rheumatology criteria for RA (14) and were seen at the Rheumatic Diseases Unit of the Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada. We used 53 control sera: 11 from systemic lupus erythematosus patients, 27 from osteoarthritic patients, 5 from patients with miscellaneous rheumatic diseases, and 10 from normal subjects. A pool of five RA sera positive for rheumatoid factor, antiperi-

This work has been presented at the 1994 American College of Rheumatology National Scientific Meeting in Minneapolis, MN on October 25–27, 1994 and has appeared in abstract form (1994. *Arthritis Rheum.* 37[Suppl.]:287a).

Address correspondence to Henri-André Ménard, Rheumatic Diseases Unit, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, 3001 12th Avenue N., Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4. Phone: 819-564-5261; FAX: 819-564-5265.

Received for publication 26 August 1994 and in revised form 5 December 1994.

J. Clin. Invest.

© The American Society for Clinical Investigation, Inc.

0021-9738/95/04/1891/06 \$2.00

Volume 95, April 1995, 1891–1896

1. *Abbreviations used in this paper:* GST, glutathione S-transferase; GST-RA-1, fusion protein; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; RA-1, cloned cDNA insert; rRA-1, recombinant protein.

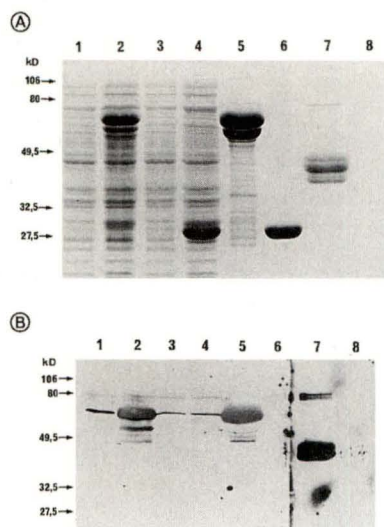


Figure 2. Purification of pGEX-4T-1-expressed recombinant proteins analyzed by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B). Recombinant proteins from *E. coli* PR745 *lon*⁻ containing pGEX-4T-1/RA-1 or parental vector were induced, purified on glutathione Sepharose 4B, and digested with thrombin as described in Methods. Proteins were either Coomassie blue stained (A) or transferred on nitrocellulose filters and antigenic proteins developed by Western blotting (B). The Western blot was

performed using a pool of five nonabsorbed rheumatoid sera diluted 100-fold. Proteins were run separately in each lane: pGEX-4T-1/RA-1 transformant cell lysates before (lane 1) and after (lane 2) induction of GST-RA-1; parental pGEX-4T-1 transformant cell lysates before (lane 3) and after (lane 4) induction of GST alone; purified GST-RA-1 (lane 5) and parental GST (lane 6) fractions eluted from glutathione Sepharose 4B; rRA-1 from the flow-through after thrombin cleavage of GST-RA-1 bound to glutathione Sepharose 4B (lane 7); and control thrombin cleavage of bound GST alone (lane 8).

tide (position 1435–2384) and the predicted amino acid (position 425–708) levels (Accession number D16217, total nucleotides: 2,493 and total amino acids: 708). The RA-1 cDNA ends at position 2384 of the published sequence of human calpastatin, 95 bp downstream from the stop codon, rather than at position 2,493, 204 bp downstream from the stop codon (19). This has no effect on homology since the lacking base pairs are located in a noncoding region. The coding sequence of RA-1 cDNA contains a nucleotide substitution (G → A) at position 1937 of calpastatin cDNA; it would result in a glycine to glutamate replacement at position 592 of the calpastatin protein. The same nucleotide difference was found in a cDNA encoding domain 4 and all the 3' noncoding region, including the polyadenylation signal and the poly-A tail, that we recently cloned using a RA-1 cDNA-derived probe (data not shown). Interestingly, the deduced amino acid sequences of pig and rabbit calpastatins, aligned with human calpastatin sequence, also have a glutamate residue at position 592. This residue is situated in a highly conserved region (19).

Expression of RA-1 cDNA and purification of the fusion and recombinant proteins. The RA-1 cDNA was subcloned in the pGEX-4T-1 vector to express a recombinant protein in the accurate reading frame. GST-RA-1 expressed in *E. coli* PR745 *lon*⁻ was affinity purified, eluted with glutathione (GST-RA-1), or the recombinant protein cleaved from its GST carrier (rRA-1). Both antigens were identified by SDS-PAGE and immunoblotting with the pool of RA sera (Fig. 2). GST-RA-1 was of the expected M_r of 65 kD (Fig. 2 A, lane 2). Two major polypeptidic bands were affinity purified from IPTG-induced RA-1 bacterial lysates using a glutathione Sepharose column (Fig. 2 A, lane 5). Only the upper of these two bands was

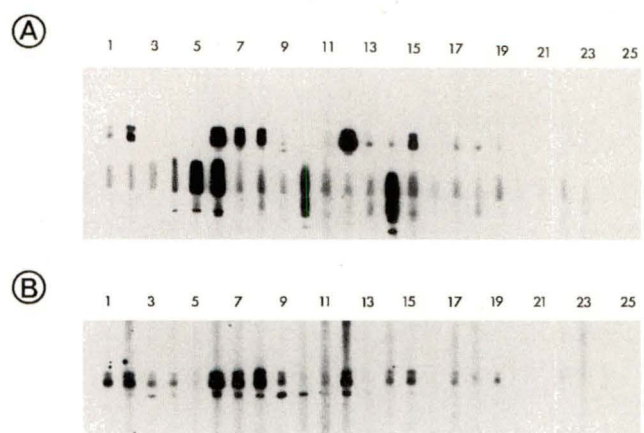


Figure 3. Recognition of GST-RA-1 (A) and rRA-1 (B) polypeptides using rheumatoid and nonrheumatoid sera. Affinity-purified GST-RA-1 and cleaved rRA-1 polypeptide were separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose sheets. These filters were probed with sera diluted at 1:100 for GST-RA-1 or at 1:50 for rRA-1. Lanes 1–19: serum from 20 patients with RA. Lanes 20–22: patients with systemic lupus erythematosus. Lanes 23–25: normal human sera. In A, sera detecting the two upper bands were considered positive. The strong signal below RA-1 bands likely represent *E. coli* contaminant proteins detected by natural antibodies. In B, the detection of the two upper RA-1 bands was considered a positive result. The results obtained with both fusion and recombinant RA-1 proteins were similar. Lanes 1, 2, 6–9, 12, 14 and 15 are strongly positive while lanes 3, 4, 11 and 17–19 are weakly positive.

strongly recognized by the serum pool (Fig. 2 B, lane 5). A few lower mol wt bands were also immunoreactive and these may represent proteolytic degradation products. A 65-kD band detected in both induced and uninduced parental pGEX-4T-1 (Fig. 2 B, lanes 3 and 4) transformant cell lysates likely represented a bacterial protein recognized by patient sera. This protein was not induced by IPTG (Fig. 2 A and B, lane 4) and it was not affinity purified from glutathione Sepharose-4B (Fig. 2 A and B, lane 6). Thrombin cleavage of rRA-1 from its GST carrier resulted in a few 40–47-kD bands (Figure 2 A, lane 7), two of which were strongly recognized by the pool of RA sera (Fig. 2 B, lane 7) and by its individual component sera (e.g., Fig. 3 B, lanes 1 and 2). Although, the predicted mol wt of rRA-1 is 36 kD, the two major antigenic bands migrated as proteins of 43 and 47 kD (Fig. 2 B, lane 7).

The 75-kD polypeptidic band (Fig. 2 B, lane 7) is an *E. coli* heat-shock protein produced by the *dnaK* gene that copurifies with the recombinant protein (20) and is recognized by natural antibodies in some nonabsorbed patient sera. The reactivity against this protein could be abolished after *E. coli* absorptions of the sera without depletion of anti-rRA-1 antibodies (data not shown). A protein with an apparent M_r of 40 kD was recognized by some sera (Fig. 3 B), independently of the recognition of the two rRA-1 bands. For example, in Fig. 3 B, the serum in lane 1 only recognized the 43- and 47-kD rRA-1 doublet, the serum in lane 10 recognized only the lower 40-kD band, while the sera in lanes 6–9 recognized all three bands. This suggests that the 40-kD band is not antigenically related to rRA-1. The absence of recognition of GST-RA-1 by sera recognizing only the 40-kD band in the rRA-1 preparation further supports this interpretation (Fig. 3 A and B, lane 10).

Table I. Detection by Immunoblotting of Anti-RA-1 and Anti-Sa Antibodies in 44 RA and 53 Control Sera

Diagnostic group*	Anti-rRA-1 antibodies	
	+	-
RA patients (n = 44)		
Anti-Sa (+)	18	10
Anti-Sa (-)	3	13
Non-RA patients† (n = 53)	2	51

* See Methods for breakdown of the non-RA group. † All non-RA patients were anti-Sa negative.

Finally, the pool of sera failed to react with GST (Fig. 2 B, lanes 4 and 6). Taken together, these results showed a strong reactivity of RA sera against the RA-1 polypeptides with a lack of detection of the GST moiety.

Reactivity of rheumatoid and control patients with fusion and recombinant RA-1. To determine whether individual sera from RA patients reacted with the RA-1 polypeptides, Western blots were performed using purified GST-RA-1 and rRA-1 (Fig. 3). The results with both proteins were similar. The two rRA-1 polypeptidic bands (43 kD and 47 kD) were recognized by 21 of 44 RA sera (45.5%) vs two of 43 (4.7%) nonrheumatoid sera and none of 10 normal sera. The two nonrheumatoid sera had the clinical diagnosis of osteoarthritis. These data show that patients with rheumatic diseases produce autoantibodies recognizing a polypeptide (rRA-1) that corresponds to two functional domains of calpastatin. They also suggest that the production of anti-rRA-1 antibodies may be preferentially, but not exclusively, associated with RA.

Because the library screening sera were anti-Sa positive and because the prevalence of anti-RA-1 and anti-Sa antibodies (8) in RA were similar, the 97 sera were also tested for anti-Sa antibodies by Western blot (Table I). 31 RA sera were concordant (18 both positive and 13 both negative) and 13 were discordant (3 anti-RA-1 positive only and 10 anti-Sa positive only). The 53 control sera were all anti-Sa negative. Because these studies did not use full length calpastatin or pure Sa as antigens, it would be premature to conclude on the presence or absence of a molecular relationship between the two autoimmune systems.

Discussion

Autoantibodies to intracellular components expressed on cell surfaces or secreted in the extracellular environment are potentially pathogenic (1–3, 21). There is substantial evidence that many disease-associated autoantibodies have the ability to interact directly with enzymes and downregulate their activity (1, 21). Recent reports further suggest that autoantibodies can also upregulate enzymatic activity through interaction with proteinase inhibitors. Thus, anti-C1-inhibitor antibodies have been detected in patients with severe episodes of angioneurotic edema and acquired C1 deficiency (22). A subpopulation of antiproteinase 3 antibodies from patients with Wegener's granulomatosis can block the interaction of this serine proteinase with its natural inhibitor alpha 1-antitrypsin (23, 24). The present report

provides another example of autoantibodies targeting a proteinase inhibitor.

Calpastatin is composed of five domains of about 140 amino acid residues each. The NH₂-terminal domain (domain L) is nonhomologous to the four others and per se has no inhibitory activity. Each of the four COOH-terminal domains (domains 1–4) is repetitive and contains one TIPPXYR consensus sequence associated with the inhibitory activity of calpastatin. Indeed, using subcloned calpastatin cDNA fragments, it has been shown that each of the four homologous domains can block the proteinase activity of calpains (25). The RA-1 clone encodes two of the inhibitory sequences, those of domains 3 and 4 of calpastatin (Fig. 1). Strong evidence suggest that RA-1 cDNA is derived from the calpastatin mRNA. First, only 1 out of 950 consecutive bp (i.e., a 99.89% identity) differentiates RA-1 cDNA from the published 3' end of the human liver calpastatin cDNA; this identity spans both the coding and an adjacent 95-bp noncoding sequence. Second, the same difference was found in an additional cDNA encoding domain 4 of calpastatin and all the 3' noncoding region, including the polyadenylation signal and the poly-A tail, that we recently cloned using a RA-1 cDNA-derived probe (data not shown). Third, this single nucleotide difference is not found when pig and rabbit calpastatin cDNAs are looked at. These data suggest either a polymorphism of the calpastatin mRNA or the existence of a sequencing mistake in the GenBank entry for human calpastatin. Thus, the immunoreactivity against RA-1 raises the hypothesis of specific immune interference with the interaction between calpastatin and calpains. However logical, this proposition remains to be demonstrated.

Proteolytic enzymes are thought to play an important role in joint destruction. These enzymes belong to three major families: the matrix metalloproteinases, the serine proteinases, and the cysteine proteinases (26). The relative importance of these proteinases and their respective inhibitors in matrix destruction remains to be definitely established in vivo. However, recent data suggest that cysteine proteinases, particularly the calpains and their natural inhibitor calpastatin, could be important (27–29). First, calpains are present in increased quantity in the synovial fluid (30–34) and membrane (13). Second, they are secreted in vitro by TNF α and IL-1-stimulated synovial fibroblast-like cells (35). Third, calpains are capable of degrading matrix components of articular cartilage and calpastatin can inhibit this degradation (29, 31, 32). Fourth, a role for synthetic cysteine proteinase inhibitors as disease-modifying antirheumatic agents has been recently proposed in adjuvant-induced arthritis of rats and in collagen-induced arthritis of mice (36).

Under normal and pathological conditions, proteinases from each major family are inactivated by their natural inhibitors: tissue inhibitors of metalloproteinases for matrix metalloproteinases (37), serpins for serine proteinases (38), and the cysteine proteinase inhibitors. The natural cysteine proteinase inhibitors are members of a superfamily including the cystatin, the stefin, and the kininogen families. Calpastatin does not belong to this superfamily and is unique in its inhibitory specificity for calpains (10). It has been suggested that an imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases could be responsible for cartilage breakdown in osteoarthritis (39). Calpastatin having been shown to be less abundant than calpains in the synovial fluid of RA patients (13), a disadvantageous enzyme/inhibitor ratio in some RA patients could also be associated with a more destructive potential of the arthri-

tis. Antibodies to calpastatin could be entirely or partly responsible for this imbalance by binding to and somehow inactivating the inhibitor following its synthesis, expression on the plasma membrane, and/or secretion in vivo. This would result in both an immune complex-mediated inflammation and an uncontrolled activity of calpains.

One interesting observation is the discrepancy between the immunoreactivity of biochemically purified placental Sa antigen and of rRA-1. Indeed, absorption of sera with rRA-1 did not completely deplete their anti-Sa reactivity (data not shown). A number of explanations are possible. First, rRA-1 may lack epitopes found on the corresponding in vivo antigen: some epitopes may be situated on the NH₂-terminal region of the protein that is not encoded by the RA-1 clone, or rRA-1 may lack antigenic posttranscriptional modifications. Second, some renaturation of the antigen blotted on nitrocellulose sheets is possible during immunoblotting; rRA-1 may thus lack some conformational epitopes found on the corresponding in vivo antigen. Third, anti-rRA-1 and anti-Sa antibodies may represent linked, but not identical, autoantibody systems, similar to anti-Ro and anti-La or to anti-U1 RNP and anti-Sm (1). The existence of anti-rRA-1 antibodies within sera of some patients without anti-Sa antibodies supports this last hypothesis. Careful definition of the epitope(s) recognized by anti-Sa and anti-RA-1 antibodies will be required to answer these questions.

The identification of calpastatin as an autoantigen in almost half of RA sera provide new research avenues. Studies are required to demonstrate the capacity of these antibodies to block the inhibitory activity of calpastatin on calpains. Furthermore, the presence of calpastatin-containing immune complexes should be demonstrated at the site of tissue damage in erosive RA. Finally, clinical correlation between the presence of anticalpastatin antibody and erosive disease will need to be systematically verified in RA and other rheumatic diseases, especially if an eventual therapeutic window is opened by synthetic cysteine proteinase inhibitors.

Acknowledgments

We thank Dr. Donald B. Bloch (Harvard Medical School, Boston, MA) for providing the human placenta cDNA library and for his invaluable help setting up the library screening. We thank Drs. Claude Asselin, Richard Leduc, and Mario S. Nemirovsky for critical advice and valuable suggestions; Moustapha El-Amrue for providing the 3' noncoding region of the calpastatin mRNA; Maryse Hamel for excellent technical assistance; and Marthe Bégin for secretarial help.

This work was supported by the Medical Research Council of Canada (grant 10387 to H. A. Ménard). N. Després and G. Boire are supported by a studentship and a clinical associateship from The Arthritis Society, respectively.

References

1. Tan, E. M. 1991. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67:841-842.
2. Burman, K. D., and J. R. Baker, Jr. 1985. Immune mechanisms in Graves' disease. *Endocr. Rev.* 6:183-232.
3. Schonbeck, S., S. Chrestel, and R. Hohlfeld. 1990. Myasthenia gravis: prototype of the autoreceptor autoimmune diseases. *Int. Rev. Neurobiol.* 32:175-200.
4. Carson, D. A. 1993. Rheumatoid factor. In *Textbook of Rheumatology*. W. N. Kelley, E. D. Harris, S. Ruddy, and C. B. Sledge, editors. W. B. Saunders Co., Philadelphia 155-163.
5. Simon, M., E. Girbal, M. Sebbag, V. Gommès-Daudrix, C. Vincent,

- G. Salama, and G. Serre. 1993. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 92:1387-1393.
6. Steiner, G., K. Hartmuth, K. Skinner, I. Maurer-Fogy, A. Sinski, E. Thalmann, W. Hassfeld, A. Barta, and J. S. Smolen. 1992. Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *J. Clin. Invest.* 90:1061-1066.
7. Hoet, R. M., A. M. Boerbooms, M. Arends, D. J. Ruiter, and W. J. van Venrooij. 1991. Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalization of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann. Rheum. Dis.* 50:611-618.
8. Després, N., G. Boire, F. J. Lopez-Longo, and H. A. Ménard. 1994. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 21:1027-1033.
9. Saitta, M. R., and J. D. Keene. 1992. Molecular biology of nuclear autoantigens. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 18:283-310.
10. Croall, D. E., and G. N. DeMartino. 1991. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 71:813-847.
11. Suzuki, K., T. C. Saido, and S. Hirai. 1992. Modulation of cellular signals by calpain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 674:218-227.
12. Squier, M. K., A. C. Miller, A. M. Malkinson, and J. J. Cohen. 1994. Calpain activation in apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 159:229-237.
13. Yamamoto, S., K. Shimizu, K. Shimizu, K. Suzuki, Y. Nakagawa, and T. Yamamuro. 1992. Calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in human arthritic synovial joints. *Arthritis Rheum.* 35:1309-1317.
14. Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-324.
15. Prchal, J. T., B. J. Morley, S. H. Yoon, T. L. Coetzer, J. Palek, J. G. Conboy, and Y. W. Kan. 1987. Isolation and characterization of cDNA clones for human erythrocyte β -spectrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7468-7472.
16. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Preparing stocks of bacteriophage λ from single plaques. In *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 2.64-2.68.
17. Sanger, F., S. Miklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
18. Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of peptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40.
19. Asada, K., Y. Ishino, M. Shimada, T. Shimojo, M. Endo, F. Kimizuka, I. Kato, M. Maki, M. Hatanaka, and T. Murachi. 1989. cDNA cloning of human calpastatin: sequence homology among human, pig, and rabbit calpastatins. *J. Enzyme Inhibition* 3:49-56.
20. Sherman, M. Yu., and A. L. Goldberg. 1992. Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 11:71-77.
21. Naparstek, Y., and P. H. Plotz. 1993. The role of autoantibodies in autoimmune diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 11:79-104.
22. Jackson, J. 1991. Autoantibody-facilitated proteolytic cleavage: a new pathogenic mechanism in autoimmunity. *Biochem. Soc. Trans.* 19:176-180.
23. van de Wiele, B. A., K. M. Dolman, C. H. van der Meer-Gerritsen, C. E. Hack, A. E. G. Kr. von dem Borne, and R. Goldschmeding. 1992. Interference of Wegener's granulomatosis autoantibodies with neutrophil proteinase 3 activity. *Clin. Exp. Immunol.* 90:409-414.
24. Dalpé, G., G. Boire, and H. A. Ménard. 1993. The conformational determinants recognized by Wegener's C-ANCA are situated at or near the catalytic domain of myeloblastin. *Clin. Exp. Immunol.* 93(Suppl.):21.
25. Emon, Y., H. Kawasaki, S. Imajoh, Y. Minami, and K. Suzuki. 1988. All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263:2364-2370.
26. Poole, R. A. 1993. Cartilage in health and disease. In *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. 12th ed. D. J. McCarty and W. J. Koopman, editors. Lea & Febiger, Malvern, PA 279-333.
27. Buttle, D. J. 1993. Lysosomal cysteine endopeptidases in the degradation of cartilage and bone. In *Textbook of Immunopharmacology Immunopharmacology of Joints and Connective Tissue*. J. T. Dingle and M. E. Davies, editors. Academic Press, New York 225-243.
28. Lenarcic, B., D. Gabrijelcic, B. Rozman, M. Drobic-Kosorok, and V. Turk. 1988. Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CIPs) in inflammatory and metabolic joint diseases. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369(Suppl.):257-261.
29. Suzuki, K., K. Shimizu, T. Hamamoto, Y. Nakagawa, T. Murachi, and T. Yamamuro. 1992. Characterization of proteoglycan degradation by calpain. *Biochem. J.* 285:857-862.

30. Huet, G., R. M. Flipo, C. Richet, C. Thiebaut, D. Demeyer, M. Balduyck, B. Duquesnoy, and P. Degand. 1992. Measurement of elastase and cysteine proteinases in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, sero-negative spondylarthropathies, and osteoarthritis. *Clin. Chem.* 38:1694–1697.
31. Suzuki, K., K. Shimizu, T. Hamamoto, Y. Nakagawa, T. Hamakubo, and T. Yamamuro. 1990. Biochemical demonstration of calpains and calpastatin in osteoarthritic synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 33:728–732.
32. Fukui, I., K. Tanaka, and T. Murachi. 1989. Extracellular appearance of calpain and calpastatin in the synovial fluid of the knee joint. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:559–566.
33. Gabrijelcic, D., A. Annan-Prah, B. Rodic, B. Rozman, V. Cotic, and V. Turk. 1990. Determination of cathepsins B and H in sera and synovial fluids of patients with different joint diseases. *J Clin Chem. Clin. Biochem.* 28:149–153.
34. Maciewicz, R. A., and D. J. Etherington. 1988. Enzyme immunoassay for cathepsin B and L in synovial fluids from patients with arthritis. *Biochem. Soc. Trans.* 16:812–813.
35. Huet, G., R. M. Flipo, C. Colin, A. Janin, B. Hemon, M. C. D'Hooghe, R. Lafyatis, B. Duquesnoy, and P. Degand. 1993. Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor α and interleukin-1. *Arthritis Rheum.* 36:772–780.
36. Esser, R. E., R. A. Angelo, M. D. Murphey, L. M. Watts, L. P. Thornburg, J. T. Palmer, J. W. Talhouk, and R. E. Smith. 1994. Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 37:236–247.
37. McCachren, S. S. 1991. Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. *Arthritis Rheum.* 34:1085–1093.
38. Opdenakker, G., and J. Van Damme. 1992. Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine.* 4:251–258.
39. Dean, D. D., J. Martel-Pelletier, J.-P. Pelletier, D. S. Howell, and J. F. Woessner, Jr. 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* 84:678–685.